

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Ramanova a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie při
excitaci 532 nm měřena na dvou odlišných sestavách**

Bakalářská práce

Autor:
Školitel:

Anna Rolečková
RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D.

Studijní program:
Studijní obor:
Forma studia:

B 1407 Chemie
Aplikovaná chemie
prezenční

Olomouc 2013

Bibliografické údaje

Autor	Anna Rolečková
Název práce	Ramanova a povrchem zesílená Ramanova spektroskopie při excitaci 532 nm měřena na dvou odlišných sestavách
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je porovnat spektra Ramanova a povrchem zesíleného Ramanova rozptylu změřená na dvou odlišných sestavách Ramanova spektrometru, ale za jinak stejných podmínek nastavení. Pro měření byla použita vybraná rozpouštědla, koloidní roztoky nanočástic vzácných kovů a jejich interakce s modelovou sloučeninou (kationtovým porfyrinem). Shodná excitační vlnová délka (532 nm) by měla zajistit, že charakter spekter pro jistou sloučeninu bude stejný bez ohledu na použitou sestavu. Rozdíly mohou být pozorovány v kvalitě (zejména rozdílný poměr signálu k šumu) a kvantitě signálu spekter.

Klíčová slova	Ramanova spektroskopie, rezonanční Ramanova spektroskopie, SERS, SNR
Počet stran	72
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author	Anna Rolečková
Title	Raman and Surface-Enhanced Raman spectroscopy at 532 nm excitation wavelength measured on two different setups
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	RNDr. Karolína Machalová Šišková, Ph.D
The year of presentation	2013

Abstract

This bachelor thesis aims to compare Raman and Surface-Enhanced Raman scattering spectra recorded on two different setups, but otherwise using the same experimental conditions. Selected solvents, colloidal solutions of noble metal nanoparticles and their interaction with a model compound (cationic porphyrin) were employed for spectra measuring. The same excitation wavelength (532 nm) should provide the same character of the spectra of a particular compound regardless the setup used. Differences can be observed in quality (namely a different signal to noise ratio) as well as quantity of spectral signal.

Keywords	Raman Spectroscopy, Resonance Raman Spectroscopy, SERS, SNR
Number of pages	72
Language	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Děkuji vedoucí své bakalářské práce RNDr. Karolíně Machalové Šiškové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a pomoc během zpracovávání bakalářské práce. Dále chci poděkovat Mgr. Vlastimilu Maškovi, Ph.D. a RNDr. Josefu Kapitánovi, Ph.D. z katedry optiky za pomoc při měření na Ramanově spektrometru na lékařské fakultě. Slova díky patří také mé rodině za toleranci, morální a finanční podporu při studiu.

Obsah

Úvod.....	8
1. Teoretická část.....	10
1.1. Vibrační spektroskopie.....	10
1.2. Vibrace a rotace molekul	10
1.3. Infračervená absorpční spektroskopie.....	12
1.4. Spektroskopie Ramanova rozptylu	15
1.4.1. Historie	15
1.4.2. C. V. Raman	16
1.4.3. Princip metody.....	17
1.4.4. Interpretace Ramanových spekter	19
1.4.5. Úprava pozadí.....	20
1.4.6. Rezonanční Ramanova spektroskopie.....	21
1.4.7. Srovnání IČ a Ramanovy spektroskopie	22
1.5. Instrumentace	22
1.5.1. Zdroje	23
1.5.2. Monochromátory	24
1.5.3. Detektory	25
1.5.4. Kyvety	26
1.5.5. Požadavky na vzorek.....	26
1.5.6. Možná uspořádání	27
1.5.7. Aplikace metody.....	28
1.6. SERS	28
1.6.1. Popis metody	28
1.6.2. Nanočástice.....	30
1.6.3. Aplikace SERS	30
1.7. UV/Vis spektroskopie	30
1.8. Měřené látky.....	31
1.8.1. Voda	31
1.8.2. Tetrahydrofuran	32
1.8.3. Acetonitril.....	32
1.8.4. Nanočástice vzácných kovů (Ag, Au)	32
1.8.5. Kationtový ve vodě rozpustný porfyrin.....	33
2. Experimentální část	35
2.1. Přístroje	35
2.1.1. Spektrometr na Přírodovědecké fakultě (PřF).....	35
2.1.2. Spektrometr na Lékařské fakultě (LF)	36

2.2.	Nastavení spektrometrů.....	36
2.3.	Chemikálie	36
2.4.	Použitý software.....	37
3.	Výsledky a diskuse	38
4.	Závěr.....	53
5.	Summary.....	55
6.	Přílohy	57
7.	Seznam obrázků.....	69
8.	Použitá literatura.....	71

Úvod

Spektroskopických metod zkoumání hmoty je celá řada. V zásadě se vžily dva způsoby rozdělení těchto metod. Podle účelu analýzy a podle povahy studované částice rozdělujeme spektroskopii na atomovou a molekulovou. A podle toho, v kterém směru sledujeme přechod ve studované částici, rozdělujeme spektroskopii na absorpční a emisní. Rozdělení na atomovou a molekulovou vyplývá především z toho, nakolik je dotyčná metoda schopná detekovat a stanovit ve vzorku prvky (atomová spektroskopie), či nakolik je schopná dát výpověď o způsobu, jak jsou atomy v molekule vázány a o struktuře molekul (molekulová spektroskopie). Přechody v molekulách jsou složitější než v atomech, protože o energetických stavech molekul rozhoduje více faktorů. Rozdíl ve spektroskopii absorpční a emisní je mimo jiné i v tom, že vlastním předmětem spektrální analýzy jsou v případě absorpční spektroskopie molekuly, atomy či ionty ve stavu základním, zatímco v případě emisní spektroskopie jsou tyto částice ve stavu vzbuzeném.¹

Ve spektroskopických metodách, jejichž podstatou je absorpce nebo emise energie ve formě elektromagnetického záření, je rozhodující poznatek, že každému stavu částice, který je popsán vlnovou funkcí, charakterizující jeho vlastnosti, odpovídá určitá hodnota energie. Spektroskopické metody lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří interakce, při nichž dochází k výměně energie mezi zkoumanou látkou a zářením, v druhém případě látka pouze určitým způsobem ovlivňuje vlastnosti procházejícího záření, aniž by docházelo k výměně energie.²

Ramanova spektroskopie je vibračně spektroskopická metoda pojmenovaná po indickém fyzikovi Chandrasekharu Venkatau Ramanovi (Nobelova cena 1930), který jev, jenž je základem metody, pozoroval spolu s K. S. Krišnarem roku 1928. Jedná se o metodu vhodnou pro identifikaci látek, při určování jejich složení a struktury. Používá se při analýze pevných látek (krystalické i amorfni materiály, kovy, polovodiče, polymery atp.), kapalin (čisté látky, roztoky vodné i nevodné), plynů, dále též při analýze povrchů (např. sorbenty, elektrody, senzory) či při analýze biologických systémů (od biomolekul až po organismy). Své uplatnění Ramanova spektroskopie nachází od mineralogie a geochemie, přes chemický a farmaceutický průmysl až po biologii a lékařství.³

Tato bakalářská práce se zaměřuje na přímé porovnání výsledků z Ramanovy spektroskopie a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, dosažených pro různé vzorky na dvou odlišných sestavách. Cílem je prokázat, že ač jsou použity rozdílné sestavy pro Ramanovu spektroskopii, avšak se stejnou excitační vlnovou délkou, tak charakter spekter pro stejnou látku se nebude lišit. Rozdíly však mohou být pozorovány v kvalitativních a kvantitativních charakteristikách získaného signálu.

1. Teoretická část

1.1. Vibrační spektroskopie

Molekulární vibrace poskytují dva typy spekter. Kvanta infračerveného záření převádějí molekulu ze základního vibračního stavu do vyššího vibračního stavu a jejich absorpcí vzniká infračervené spektrum. Kvanta viditelného, ultrafialového a infračerveného záření dají tytéž výsledky o vibračních hladinách, avšak získáme je ve spektrech neelastického rozptylu neboli v tzv. Ramanových spektrech. V praxi nejvíce využívanou oblastí analýzy organických látek je oblast $4000\text{--}666\text{ cm}^{-1}$, i když v poslední době byl projeven zvýšený zájem o blízkou infračervenou oblast $14200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ a vzdálenou IČ oblast $700\text{--}200\text{ cm}^{-1}$. Zvláště výhodné je použití Ramanovy spektroskopie ve vzdálené IČ oblasti od 10 cm^{-1} do 200 cm^{-1} , i když Ramanovo spektrum je možno získat v celé oblasti infračerveného spektra od 10 do 4000 cm^{-1} .⁴

1.2. Vibrace a rotace molekul

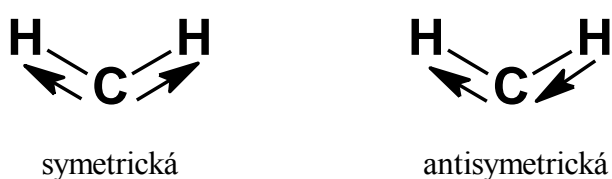
Absorpcí kvanta infračerveného záření přechází molekula ze základního do některého ze vzbuzených vibračních stavů. Takový přechod je zpravidla doprovázen excitací do některého ze stavů rotačních, navíc v oblasti nízkoenergetického záření některé molekuly vykazují přechody do čistě rotačních stavů, hovoříme tedy souhrnně o vibračně-rotační spektroskopii. Vzhledem k velikosti kvanta energie potřebného k excitaci do některého ze vzbuzených vibračních stavů, nachází se za normální teploty naprostá většina molekul v základních vibračních stavech. K přechodu do stavu vzbuzeného je proto třeba, aby molekula nabyla prostřednictvím interakce se světelným zářením energii, která rozdíl obou stavů odpovídá. Může se tak stát buď přímo absorpcí infračerveného záření vzorkem prostřednictvím infračervené spektroskopie, nebo prostřednictvím Ramanova rozptylu (Ramanova spektroskopie).⁵

Absorpcí elektromagnetického kvanta může molekula zvýšit svou energii elektronovou (elektron je převeden z nižší hladiny na vyšší), vibrační (zvýší se amplituda vibračního pohybu atomů uvnitř molekuly) nebo rotační (zvýší se úhlová rychlost rotace molekuly jako celku kolem její osy). Hladiny energie elektronů jsou od sebe velmi vzdáleny, takže k převedení elektronu na vyšší hladinu je potřeba zářivých kvant o poměrně vysoké energii, tedy vysokém kmitočtu (nízké vlnové délce). Jedná se o oblast vlnových délek asi $200\text{--}1000\text{ nm}$, tedy o oblast

ultrafialového a viditelného záření. V oblasti infračerveného záření postačuje energie záření k převedení molekuly z nižšího do vyššího vibračního stavu. Proto se infračervená a Ramanova spektroskopie označuje jako spektroskopie vibrační. Rotační hladiny leží ještě mnohem blíže u sebe, takže kvantum záření z infračervené oblasti nemůže vyvolat čistě rotační přechod.⁶

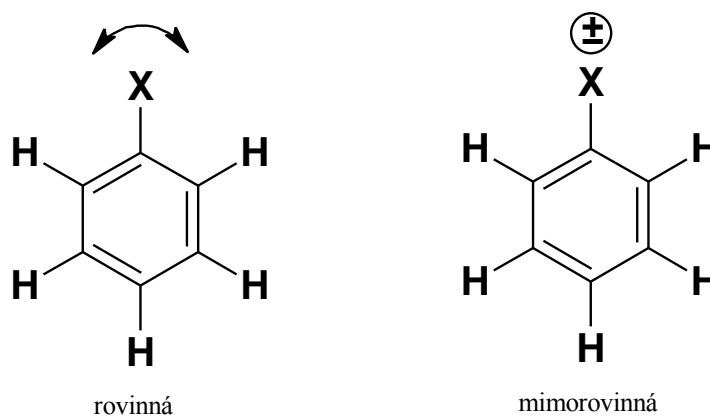
Vibrace dělíme v praxi na dvě základní skupiny:

a) valenční vibrace, probíhající v podstatě ve směru vazby mezi dvěma atomy. Označují se většinou písmenem ν . U skupin typu XY_2 (jako je např. CH_2) nelze přiřadit vibrace jednotlivým vazbám X-Y, skupinu posuzujeme jako celek a rozeznáváme zde symetrickou a antisymetrickou valenční vibraci (viz obr. 1).



Obrázek 1: Valenční vibrace⁶

b) deformační vibrace: dochází při ní k deformaci valenčních úhlů. Často je pro danou skupinu možný větší počet deformačních než valenčních vibrací, proto se dále dělí podle způsobu deformace. U rovinných molekul (např. benzen) rozlišujeme rovinnou deformační vibraci, probíhající v rovině molekuly a mimorovinnou vibraci, probíhající kolmo na tuto rovinu (viz obr. 2).⁶



Obrázek 2: Deformační vibrace pro molekulu benzenu⁶

Volná molekula (plynu) může jako celek rotovat. Obdobně jako vibrační energie je i rotační energie kvantována. Molekula může absorbovat kvantum elektromagnetického záření a jeho energii použít k přechodu na vyšší rotační hladinu (příčemž se zvýší úhlová rychlost rotace). Rotační hladiny leží ovšem velmi blízko

sebe, takže energie elektromagnetického kvanta z oblasti infračervené je pro využití k čistě rotačnímu přechodu příliš vysoká. Molekula je v základním vibračním stavu na určité hladině rotační energie. Jestliže absorpcí záření dojde k vibračnímu přechodu, může současně dojít ke změně rotační energie. Jestliže se rotační energie zvýší, bude frekvence pohlceného záření vyšší, než by odpovídalo čistě vibračnímu přechodu. Při snížení rotační energie bude frekvence záření nižší.⁶

1.3. Infračervená absorpční spektroskopie

Infračervená spektroskopie je jednou ze spektroskopických metod, které tvoří hlavní součást optických analytických metod; je tedy založena na interakci hmoty se zářením. U spektroskopických metod je tato interakce spojena s výměnou energie mezi hmotou a zářením: buď se snižuje vnitřní energie látky, která přitom emituje kvantum elektromagnetického záření (emisní spektroskopie), nebo, jak je tomu v případě infračervené spektroskopie, látka energetické kvantum záření absorbuje a zvýší na jeho účet svou vnitřní energii (absorpční spektroskopie). V infračervené spektroskopii se procesu zúčastňuje molekula jako celek, takže mluvíme o jedné z metod molekulové spektroskopie.⁶

Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné. Pokrývá část elektromagnetického spektra v intervalu mezi 0,75 a 1000 μm . V infračervené spektroskopii se běžně místo vlnové délky na ose x používá vlnčet. Nejdůležitější oblast pro infračervenou spektroskopii je oblast 4000–670 cm^{-1} . Infračervenou oblast spektra rozdělujeme na tři části: blízká infračervená oblast (12800–4000 cm^{-1}), střední infračervená oblast (4000–200 cm^{-1}) a vzdálená infračervená oblast (200–10 cm^{-1}). Energie infračerveného záření již nestačí na změny elektronových stavů, způsobuje pouze změny vibračních a rotačních stavů molekul.⁷

Principem infračervené spektroskopie je absorpce infračerveného záření molekulami látek. Absorbovat může jen záření, jehož energie odpovídá příslušným vibračním a rotačním přechodům. Tato jsou u různých skupin atomů různé. Proto z vlnočtu absorbovaného záření získáváme informace pro kvalitativní analýzu. Změna vibračně-rotačního stavu molekuly absorpcí infračerveného záření může nastat jen tehdy, když tím dojde ke změně dipólového momentu molekuly.⁷

Infračervené spektrum je vysoce charakteristické pro danou molekulu. Neexistují dvě látky, které by měly do všech podrobností stejné infračervené spektrum.

Porovnáváme-li polohu pásů valenčních a deformačních vibrací pro tutéž skupinu atomů, zjistíme, že vlnočty u valenčních vibrací jsou vyšší než u deformačních. Infračervené spektrum rozdělujeme na dvě oblasti.

- a) Oblast skupinových vibrací (charakteristických vibrací). Mezi vlnočty 4000 až 1500 cm^{-1} nacházíme absorpční pásy vibrací různých funkčních skupin, proto tuto oblast využíváme pro identifikaci těchto skupin v molekule organické látky. Hodnoty těchto vibrací jsou ovlivněny strukturním okolím dané skupiny, např. přítomností konjugovaných násobných vazeb, pnutím cyklických systémů, přítomností jiných vibrujících skupin.
- b) Oblast otisku prstu. Mezi vlnočty 1500 až 670 cm^{-1} nacházíme pásy deformačních vibrací skupin, které jsou velmi ovlivněny okolními vazbami a celkovou strukturou molekuly. Protože jsou tyto vibrace určeny vibračním chováním celého skeletu molekuly, nenajdeme dvě látky, které by měly svá spektra v oblasti otisku prstu shodná. Počítačovým srovnáním spektra s elektronickou knihovnou spekter je možno identifikovat organickou látku.⁷

Význam infračervené spektroskopie vyplyne ze skutečnosti, že i relativně jednoduchá molekula dává charakteristické spektrum, které je možno využít k identifikačním účelům. Je totiž nepravděpodobné, že jakékoli dvě sloučeniny, s výjimkou optických enantiomerů, dávají totéž vibrační spektrum. I když vibrační spektrum je charakteristické pro celou molekulu, je známo, že některé funkční skupiny mají absorpční pásy ve spektrech poblíž určitého vlnočtu, bez zřetele na strukturu zbytku molekuly. Tato skutečnost je velmi výhodná, neboť i zběžný pohled na spektrum dá informaci o přítomnosti charakteristických skupin atomů v molekule (viz. tab. 1).⁴

Tabulka 1: Charakteristické vibrace¹

Skupina	Vlnočty charakteristické vibrace (cm^{-1})		
	valenční	deformační	
		rovinné	mimorovinné
O – H	3670-3000	1600	800-500
N – H	3500-3000	1640	

C – H aromatického charakteru	> 3000		
C – H alifatického charakteru	< 3000		
C = O	1950-1500		
NO ₂	1460-1430	800-900	
C ≡ C	2300-2200		
C = C	1660-1400		
C ≡ N	2300-2200		
C = N	1660-1500		
C – F	1100		
C – Cl	850-700		

Mezi intenzitou absorpčních linií a obsahem absorbující skupiny ve vzorku platí Lambert-Beerův zákon, takže infračervenou spektroskopií je možno použít jako metodu kvantitativní analýzy. Obrovskou výhodou infračervené spektroskopie je to, že dovoluje měřit vzorky ve všech skupenských stavech, tedy tuhém, kapalném a plynném.¹

Vibrační energie vazby se může zvýšit absorpcí elektromagnetického záření jen tehdy, mění-li se při vibraci její dipólový moment. Tyto vibrace se označují jako aktivní v infračerveném spektru. Nedochozí-li k jeho změně (např. u homonukleárních biatomických molekul jako je O₂, N₂, Cl₂, které dipólový moment nemají), molekula neabsorbuje infračervené záření.⁸

Aby mohla molekula přímo absorbovat infračervené záření, musí vibrovat tak, že nastává posun centra elektrického náboje, tj. dipólový moment molekuly při vibraci se musí měnit. Dipólový moment je součin náboje a vzdálenosti mezi náboji, proto se mění se změnou délky vazby.⁷

Celkový dipólový moment molekuly a jeho změny při vibraci souvisejí se symetrií molekuly. Při symetrické vibraci dochází k současnému prodlužování obou vazeb v opačném směru, takže výsledný dipólový moment je opět nulový. Symetrická valenční vibrace je tedy v absorpčním infračerveném spektru neaktivní.

Při antisymetrické vibraci se současně jedna vazba zkracuje a druhá prodlužuje, takže dipólové momenty vazeb se již nekompenzují, ale sčítají. Během vibrace tedy dochází ke změně celkového momentu, antisymetrická vibrace je ve spektru aktivní.²

Infračervená spektroskopie je používána ke stanovení řady anorganických i organických látek a při kontrole čistoty látek. Anorganické látky je možno např. stanovit v aerosolech. V medicíně byla použita pro určování složení ledvinových kamenů, pro stanovení sacharidů v krvi, při diagnostice zhoubných nádorů. Velmi často je pomocí infračervené spektroskopie určovány koncentrace ropných látek ve vodě, v půdách a v mořských sedimentech. Rozsáhlého použití dosáhla infračervená spektroskopie v kriminalistice. Je to především důkaz a rychlá analýza drog a zneužívaných léčiv, nebo identifikace pachatele na základě několika vláken z oděvu nebo úlomky barev na místě autonehody.²

1.4. Spektroskopie Ramanova rozptylu

1.4.1. Historie

Rakouský fyzik A. Smekal počátkem dvacátých let minulého století teoreticky předpověděl a indický fyzik Chandrasekhara V. Raman v roce 1928 objevil a popsal (Nobelova cena 1930) kombinovaný rozptyl záření na hmotných předmětech. Tento jev, dodnes označovaný jako Ramanův, byl ještě koncem dvacátých let Kohlrauschem a Dadienem v Grazu poprvé použit k systematickému studiu různých organických sloučenin.¹

V roce 1928, kdy C. V. Raman objevil tento jev později pojmenovaný po něm, byla dostupná pouze velmi hrubá instrumentace. Sir Raman použil světelné záření jako zdroj, dalekohled jako sběrač paprsků a své oči jako detektor. Postupně docházelo k vylepšení jednotlivých komponent Ramanových spektrometrů. Nejprve se výzkum zaměřil na vylepšení excitačního zdroje. Byly vyrobeny různé lampy (helium, zinek, atd.), které ale byly nepoužitelné kvůli nízké intenzitě. V roce 1914 byla vytvořena rtuťová výbojka, ale až někdy po roce 1930 byla upravena pro Ramanovu spektroskopii. V roce 1962 se začaly jako zdroje v Ramanově spektroskopii využívat lasery. K detekci Ramanova jevu se používaly fotocitlivé materiály, teprve po druhé světové válce se začaly používat přístroje fungující na fotoelektrickém jevu. Vývoj optiky pro Ramanovu spektroskopii začal po roce 1960. Bylo zjištěno, že dvojitý monochromátor odstraňuje rozptýlené světlo lépe než jeden monochromátor

a později byl nalezen ještě účinnější trojitý monochromátor. V roce 1968 byly objeveny holografické mřížky. V dnešní době je možno získat Ramanova spektra také pomocí Fourierovy transformace.⁹

1.4.2. C. V. Raman

Indický fyzik Raman (viz obr. 3) je prvním přírodovědcem z asijského kontinentu, kterému byla udělena Nobelova cena. Jeho otec byl učitelem fyziky. Raman vynikal už jako student na univerzitě v Madrásu, kde promoval se zlatou medailí jako nejlepší student fyziky. V roce 1917 se stal profesorem na univerzitě v Kalkatě. Od roku 1947 byl ředitelem výzkumného ústavu v Bangaloře, který nese jeho jméno.¹⁰



Obrázek 3: C. V. Raman²⁴

Zabýval se akustikou i optikou, v akustice kmitáním struny a fyzikou hudebních nástrojů. Nejvýznamnějších výsledků dosáhl v roce 1928 při výzkumu rozptylu světla, na molekulách, kapalinách i při difrakci na pevných látkách. Při studiu kombinačního rozptylu světla, kdy při průchodu světla látkami jsou pozorovány kromě frekvence dopadajícího světla i vyšší a nižší frekvence, které jsou ovlivňovány rozptylujícím prostředím. Tento kombinační rozptyl nese jméno Ramanův a pomáhá řešit strukturní otázky rozptylujícího prostředí molekul, plynů, kapalin i pevných látek. Za tento objev byl poctěn Nobelovou cenou na fyziku pro rok 1930. Stejný objev učinili při studiu rozptylu světla na monokrystalech křemene a ve stejnou dobu na Lomonosově univerzitě

v Moskvě L. I. Mandelštam a G. S. Landsberg, kteří Nobelovu cenu stejně jako Ramanův spoluobjevitel Krišnan nezískali.¹¹

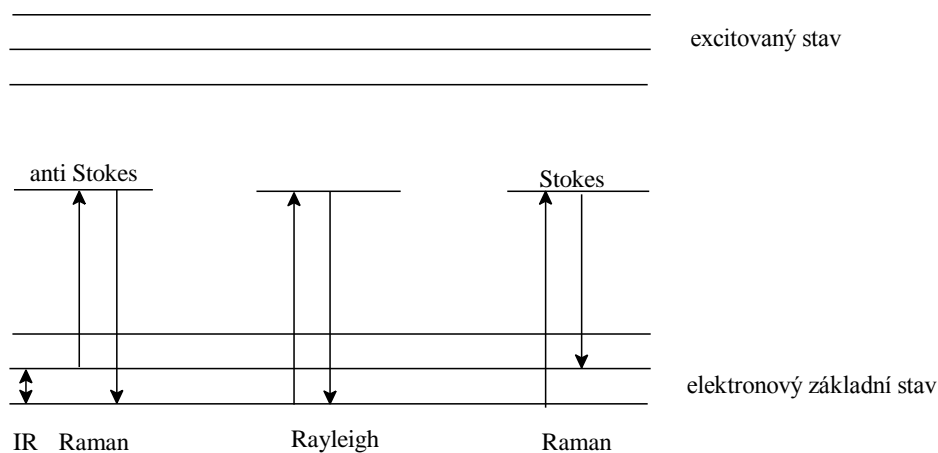
1.4.3. Princip metody

Principem metody je měření rozptýleného záření, které vzniká interakcí monochromatického záření v oblasti viditelné až blízké infračervené s molekulami vzorku za současné změny jejich vibračních a rotačních stavů.⁷ Záření, které dopadá na vzorek, tímto vzorkem částečně prochází, zčásti je absorbováno a zčásti rozptylováno. Zhruba podíl 10^{-5} intenzity záření dopadajícího na vzorek je rozptylováno a dále, zhruba 1 % z tohoto rozptýleného záření má jinou frekvenci, než záření ze zdroje. Rozptýlené záření o frekvenci shodné s frekvencí zdroje se nazývá Rayleighův rozptyl a rozptýlené záření o frekvenci rozdílné se nazývá Ramanův rozptyl nebo také kombinovaný rozptyl. Pro spektroskopii bylo důležité zjištění, že frekvence tohoto Ramanova záření je dána součtem a rozdílem frekvence budícího záření ze zdroje a frekvence vibrací v molekulách vzorku a že podmínkou vzniku Ramanova záření je, aby se při vibraci vazby ve studované molekule měnila její polarizovatelnost.¹

Polarizovatelnost molekuly je v podstatě mírou schopnosti posouvat v molekule náboje působením elektrického pole a vytvářet indukovaný dipól. Polarizovatelnost molekuly má úzký vztah k charakteru molekulových orbitalů. Změna polarizovatelnosti je způsobena jejich deformací.⁷

Ramanova spektroskopie je založena na neelastickém rozptylu záření (užívá se intenzivní viditelné světlo), jehož energie neodpovídá žádnému z excitovaných stavů, zpravidla je vyšší nežli energie vibračních přechodů a nižší nežli energie přechodů elektronových. Při interakci tohoto záření s molekulou dojde k absorpci primárního fotonu a téměř okamžitě zářivé reemisi sekundárního fotonu (rozptýleného záření). Z krátkodobě existujícího virtuálního přechodového stavu se molekula vrací buď zpět do vibračního základního stavu (Rayleighův rozptyl) nebo do jiného vibračního stavu, který je energeticky blízký původnímu základnímu stavu (viz obr. 4). Molekula tedy v průběhu Ramanova rozptylu může přecházet pouze mezi svými vibračními stavy. Ve spektru emitovaného záření potom sledujeme dvě série linií, na energetické stupnici symetricky rozložené okolo intenzivní čáry Rayleighova

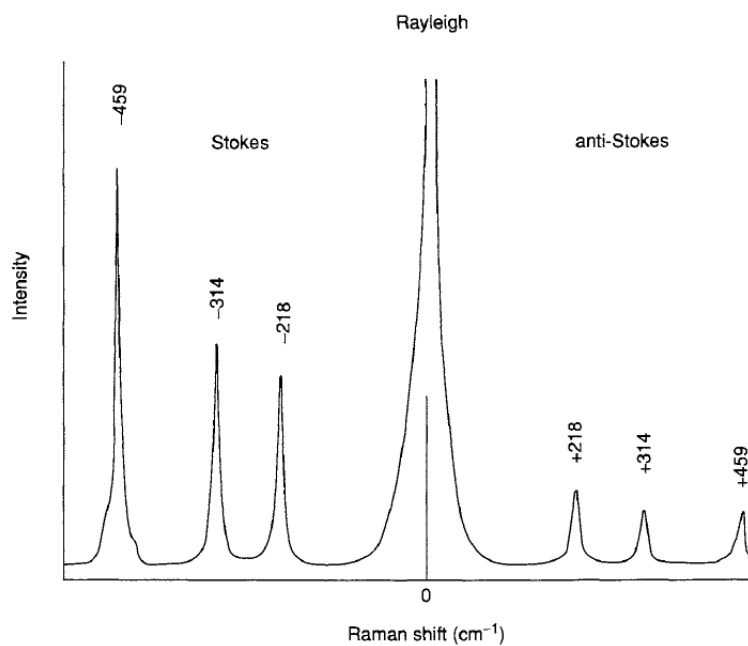
rozptylu. Tyto linie nazýváme Stokesovy a mnohem slabší anti-Stokesovy. V praxi se využívá téměř výhradně Stokesových linií.⁵



Obrázek 4: Ramanův rozptyl⁵

Anti-Stokesova větev se využívá v případech, kdy na vzorek působící záření vyvolává také fluorescenci vzorku, která Stokesovu oblast překryje.¹²

Ačkoli Stokesova linie a její protějšek anti-Stokesovy linie jsou stejně vzdáleny od Rayleighovy linie, nemají stejnou intenzitu (viz obr. 5). I když Stokesovy a anti-Stokesovy linie nesou stejnou informaci o frekvenci, obvykle se zaznamenává pouze silnější (Stokesovy linie) část spektra.¹³



Obrázek 5: Stokesovy a anti-Stokesovy linie⁹

Z teorie Ramanovy spektroskopie vyplývá, že podmínkou aktivity v Ramanově spektru je změna polarizovatelnosti molekuly (tj. schopnosti elektrických nábojů v molekule posouvat se vlivem elektrického pole) v průběhu vibrace. Tuto schopnost mají především nepolární části molekul, zatímco polární jsou málo polarizovatelné. Proto se v Ramanově spektru projevují intenzivními pásy zejména vibrace nepolárních vazeb, jejichž polarizovatelnost se při vibraci výrazně mění.²

Ramanova spektroskopie bývá z hlediska strukturní chemické analýzy doplňkem infračervené absorpční spektroskopie. Je to kvůli tomu, že Ramanova spektroskopie detekuje vibrace, při nichž nedochází ke změně dipólového momentu vazby, a dále proto, že vlastně dovoluje zjišťovat frekvence vibrací molekul pomocí záření v oblasti viditelné nebo ultrafialové popř. blízké infračervené, což umožňuje používat jednak přístrojovou optiku z materiálů jako jsou sklo nebo křemen, jednak rozpouštědla (např. voda), která by v infračervené oblasti záření interferovala.¹

Když je vzorek ozařovaný laserovým paprskem a energie fotonů použitého záření nepostačuje na vyvolání elektronového přechodu v molekule (nedochází k jeho absorpci elektronovými přechody), tak vzhledem na rozměry molekuly a vlnové délky použitého laserového záření, většina fotonů dopadajícího záření prochází vzorkem (plyn nebo kapalina) nebo je odražená (tuhá neprůhledná látka). Část fotonů dopadajícího záření může být rozptylována makroskopickými částicemi vzorku (Tyndalův rozptyl), když energie rozptýleného záření je stejná jako energie dopadajícího záření. Nebo podléhá interakci s molekulami vzorku, při které narazí na molekulu, interaguje s elektronovými oblaky vazeb v molekule a deformuje (polarizuje) je. Když energie dopadajícího záření nepostačuje na vyvolání elektronového přechodu, tak při anihilaci dopadajícího fotonu tato interakce převede molekulu jen do velmi nestabilního krátkodobého virtuálního stavu a energie dopadajícího fotonu se následně molekulou velmi rychle opětovně vyzáří do okolí ve formě vytvořeného rozptýleného fotonu.⁸

1.4.4. Interpretace Ramanových spekter

Interpretace Ramanova spektra je obdobná, jako interpretace infračerveného spektra, avšak intenzity pásů v jednotlivých spektrech se mohou vzájemně lišit vzhledem k rozdílnému fyzikálnímu principu obou spektroskopii.

Nenasycené vazby ($-C\equiv C-$, $-C=C-$, $-C\equiv N$, atd.) poskytují intenzivní Ramanovy pásy a slabé IČ pásy mezi $1600 - 2300 \text{ cm}^{-1}$. Valenční vibrace polárních $-N-H$, $-O-H$ vazeb dávají velmi silnou absorpci v IČ oblasti spektra, ale slabý Ramanův rozptyl. Karbonylové a karboxylové frekvence jsou intenzivní v Ramanově i v infračervených spektrech. Aromatické sloučeniny poskytují intenzivní absorpci v Ramanových i v infračervených spektrech. U skupin, jako jsou $O=C=O$, $C-O-C$, $N=C-N$, atd., bývá jedna symetrická a jedna antisymetrická vibrace. Symetrická vibrace bude silná v Ramanově spektru a slabá v infračerveném. Antisymetrická vibrace bude silnější v infračerveném a slabší v Ramanově spektru.⁴

Všechna teoretická pravidla o poloze pásů ve spektrech i ostatní vztahy jsou jen obecnou pomůckou pro interpretaci spekter. Skutečná schopnost interpretovat spektra se získá jedině pečlivým studiem literatury a dlouhodobou zkušeností. Pracovník, který zhotovuje vibrační spektrum, by měl mít již hotovou elementární analýzu a hrubou představu o tom, co jeho vzorek může, či nesmí obsahovat. Je-li např. známo, že vzorek neobsahuje dusík, pak pásy, které by jinak mohly příslušet alkoholu nebo aminu, musí náležet alkoholu.⁴

Ramanovo spektrum je pro identifikaci výborným „otiskem palce“, zejména je-li při porovnání změřených a databázových dat dodržena podmínka, že Ramanova spektra byla získána pro stejný fyzikální stav látky. K jednoznačné identifikaci látek jsou však nutné buď tištěné, nebo elektronické knihovny spekter.³

1.4.5. Úprava pozadí

Jak již bylo výše řečeno, signál Ramanova rozptylu v porovnání s elastickým rozptylem (Rayleigh) je málo intenzivní. Je proto třeba pečlivě odstranit ze vzorku vše, co způsobuje vznik pozadí a překrývá spektrum. Největším zdrojem pozadí v kyvetě je fluorescence vzorku. Fluorescenční jevy jsou mnohem silnější než Ramanovo spektrum, takže fluoreskování i stopových znečištěnin může Ramanovy čáry zcela překrýt. Častými fluoreskujícími nečistotami jsou stopy tuku a pryže. Dalším velmi intenzivním zdrojem pozadí v samotném vzorku je rozptyl světla na nehomogenitách. Patří mezi ně zejména prachové částice a nerozpustné sraženiny.^{4,2}

1.4.6. Rezonanční Ramanova spektroskopie

Mnoho látek, hlavně barevných, může absorbovat energii záření laseru a generovat silnou fluorescenci, která potom částečně nebo úplně překrývá Ramanovo spektrum vzorku. To bývá jedním z hlavních problémů v Ramanově spektroskopii, hlavně když se jako zdroje excitačního záření použijí lasery z UV oblasti. Avšak jsou některé typy barevných látek, které za určitých podmínek mohou produkovat silný Ramanův rozptyl namísto fluorescence. Tento efekt, který se nazývá rezonanční Ramanův rozptyl, nastane, když frekvence použitého excitačního laseru odpovídá frekvenci záření potřebného na přechod elektronu v molekule zkoumané látky do elektronového excitovaného stavu a rezonuje s ním. Potom intenzita Ramanových pásů, které pocházejí z těch částí molekuly, kde nastal elektronový přechod, se může zesílit o 3–6 řádů. To znamená, že ne všechny pásy v konvenčním Ramanově spektru se zesílí. Obvykle skupiny, které v molekule způsobují jejich barevnost, tzv. chromofory, vykazují největší zesílení. Důvodem je, že právě tyto chromoforové skupiny nejvíc absorbují dopadající excitační záření. Nejvyšší intenzita rezonančního Ramanova signálu se získá, když frekvence dopadajícího záření se rovná frekvenci záření potřebného na přechod do prvního nebo druhého elektronového vzbuzeného stavu. Z tohoto důvodu jsou tedy laditelné lasery nejvhodnějšími zdroji záření pro techniku rezonanční Ramanovy spektroskopie. I když frekvence záření laseru neodpovídá přesně frekvenci potřebné na přechod do elektronově vzbuzeného stavu, výrazné zvýšení Ramanova signálu může nastat.⁸

Tento aspekt rezonanční Ramanovy spektroskopie se stane velmi užitečný v případě velkých biomolekul, které ve své struktuře obsahují chromofory. Uvedené až 10^6 -násobné zvýšení rezonančního Ramanova signálu v porovnání s konvenční Ramanovou spektroskopií umožňuje studovat a získat Ramanova spektra vzorků s velmi nízkou koncentrací až 10^{-8} mol/l.⁹ Tato úroveň citlivosti je v kontrastu s konvenční Ramanovou spektroskopií, která je limitována koncentrací větší než 0,1 mol/l.⁷ Hlavní nevýhodou rezonanční Ramanovy spektroskopie je zvýšené riziko fluorescence a fotodegradace vzorku v důsledku působení vyšší energie excitačního laserového záření.⁸

Asi nejdůležitější aplikace rezonanční Ramanovy spektroskopie je studie biochemických molekul. Umožňuje měření v přítomnosti vody a při velmi

nízkých koncentracích vzorku. Například je tato technika využívána k určování oxidačních stavů a spinu atomů železa v hemoglobinu a v cytochromu c.¹²

1.4.7. Srovnání IČ a Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie doplňuje infračervenou spektroskopii při studiu vibračních vlastností molekul. V Ramanových spektrech jsou vidět takové vibrační pásy molekul, u kterých dochází ke změně polarizovatelnosti. Toto je rozdílné od infračervené spektroskopie, kde musí docházet ke změně dipólového momentu během vibračního pohybu. Díky tomuto rozdílu mohou být, Ramanova a infračervená spektroskopie používány navzájem jako doplňkové. Molekuly, které mají zřetelná spektra v infračervené spektroskopii, nemusí mít intenzivní vibrační pásy ve spektru Ramanovy spektroskopie a naopak. Pro kvalitativní určení látek lze použít Ramanovu spektroskopii a srovnat naměřená spektra s knihovnamí a identifikovat tak látky. Ramanova spektroskopie je použitelná i pro kvantitativní analýzu. Přítomnost vody není, na rozdíl od infračervené spektroskopie, ve spektroskopii Ramanova rozptylu kritická, protože účinný průřez rozptylu pro molekuly vody je v porovnání se zkoumanými molekulami malý.¹⁴

Mezi hlavní experimentální výhody Ramanovy spektroskopie patří možnost měření vodných roztoků látek. Intenzita Ramanova rozptylu pro vodu je velmi nízká a optické materiály používané v Ramanově spektroskopii nejsou citlivé na vlhkost. Další velkou výhodou je možnost snadného měření roztoků, tenkých povrchových filmů, pevných vzorků a krystalů, a to i ve velmi malém množství měřené látky (Ramanova mikroskopie). Výhoda při analýze pevných látek je možnost měření materiálů bez jakékoli úpravy.³

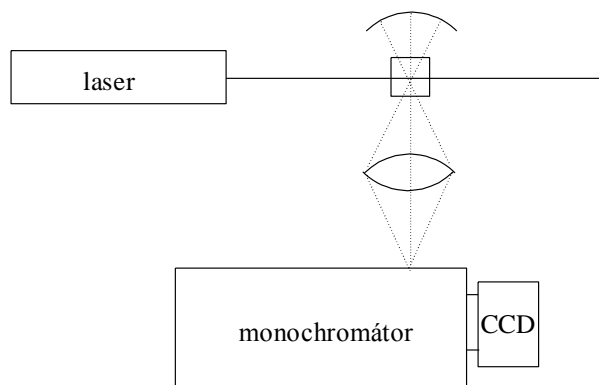
Vzhled infračervených a Ramanových spekter je silně ovlivněn symetrií molekul a symetrií jednotlivých vibračních pohybů. Pro molekuly s nízkou symetrií jsou pásy všech vibrací pozorovatelné v obou typech spekter, ovšemže s odlišnou intenzitou. Pro molekuly s vysokou symetrií a zejména se středem symetrie se stává spektrum infračervené a Ramanovo navzájem doplňkovými (komplementárními).⁴

1.5. Instrumentace

První Ramanův spektrometr byl zkonstruovaný roku 1928 a používal jako zdroj záření monochromatické světlo ze slunečního záření a lidské oko jako detektor.

Později byly zdrojem záření obloukové lampy a fotografická plátna sloužila jako detektory. Od té doby Ramanovy spektrometry prošly značným vývojem a výrazně se změnily.

Měření spekter Ramanova rozptylu využívá poměrně jednoduché zařízení (viz obr. 6):



Obrázek 6: Schéma Ramanova spektrometru⁵

Budící monochromatické záření laserového zdroje je zaostřeno na vzorek a ve vhodném úhlu je opticky sbíráno záření, které vzorek rozptyluje. Nejběžnější uspořádání sbírá záření v kolmém směru na směr budícího záření, existují však i jiné možnosti měření, například geometrie zpětného rozptylu. S ohledem na nízkou energetickou účinnost Ramanova rozptylu je třeba záření sbírat pomocí světelné optiky v poměrně širokém úhlu. V sebraném svazku rozptýleného záření je nejprve potlačena Rayleighova linie pomocí vhodného interferenčního filtru a posléze je zaostřeno na vstupní štěrbinu obvykle dvojitého monochromátoru s vysokou disperzí a dobrým potlačením rozptýleného světla. Na jeho výstupu je připojen mnohokanálový detektor, představovaný chlazenou CCD kamerou, následovanou počítačem.⁵

1.5.1. Zdroje

Jako excitační zdroje pro Ramanovu spektroskopii se používaly rtuťové výbojky. Rtuťové výbojky ale poskytují málo linií, které se vhodnými filtry dají poměrně snadno izolovat.⁴

K excitaci Ramanova rozptylu se dnes užívají výhradně lasery. Ve viditelné oblasti se používají hlavně He-Ne laser (červená linie 633 nm), argonový iontový laser (více čar – od modré 457 nm, přes modrozelenou 488 nm, k zelené 514,5 nm) a kryptonový iontový laser (červená linie 647 nm, žlutá čára 568 nm).

Pro excitaci v blízké infračervené oblasti (NIR) je obvyklý Nd-YAG laser (neodymem dotovaný yttritohlinitý granát, $Y_3Al_5O_{12}$) s linií 1064 nm.^{3,8}

Pro rutinní Ramanovu spektroskopii pracují lasery v kontinuálním nebo kvasikontinuálním režimu. Výhodou excitace ve viditelné oblasti je vyšší intenzita rozptylu, naopak zásadní nevýhodou jsou rizika velmi intenzivní fluorescence nebo nežádoucí fotochemické reakce. Tato rizika jsou dána polohou virtuální hladiny v oblasti elektronově excitovaných hladin. Právě potlačení rizika nežádoucích fotochemických a fotofyzikálních procesů je hlavní výhodou excitace Ramanova jevu v NIR oblasti, kdy virtuální hladina je pod úrovní elektronově excitovaných stavů.³

Laser může být buď přímo zabudovaný ve spektrometru, nebo se může využít i světelný paprsek z externího zdroje. Vyšší vlnová délka zdroje zlepšuje disperzi na mřížce, tím i rozlišení, ale drasticky snižuje intenzitu signálu. Výběr vlnové délky laseru záleží na tom, zda je pro nás důležitější snížená doba snímání nebo vyšší optické rozlišení.¹⁵

1.5.2. Monochromátory

Z rozptýleného záření je třeba nejprve odfiltrvat Rayleighův rozptyl. Tím pro běžné přístroje dochází ke ztrátě informace v oblasti Ramanových posunů $\pm 100 \text{ cm}^{-1}$ okolo polohy excitační linie. Pro tuto filtraci se běžně používají holografické filtry nebo jednoduché premonochromátory. V případě FT Ramanova spektrometru (Ramanův spektrometr s Fourierovou transformací) pak záření vstupuje do interferometru. FT Ramanův spektrometr je vybaven děličem paprsků, kde polopropustná vrstva je deponována na křemenném prvku. Interferometricky modulované záření dopadá na vysoce citlivý detektor, obvykle germaniový, chlazený kapalným dusíkem.³

Když je Ramanův rozptyl slabý, hlavním problémem Ramanovy spektroskopie je jeho separace od podstatně intenzivnějšího Rayleighova rozptylu. Hlavním problémem není samotný Rayleighův rozptyl, ale skutečnost, že intenzita rozptýleného záření z Rayleighova rozptylu může značně převýšit intenzitu Ramanova signálu. V mnohých případech se problém řeší jednoduše odstraněním spektrálního rozsahu v blízkosti vlnové délky záření laseru, kde má rozptýlené záření nejvýraznější efekt. Toto je možno uskutečnit použitím komerčních interferenčních filtrů, které odstraní spektrální rozsah $\pm 80\text{--}100 \text{ cm}^{-1}$

od frekvence laseru. Tento způsob je sice efektivní v eliminování rozptýleného Rayleighova záření, ale nedovoluje tak detekci Ramanova rozptylu v oblasti pod 100 cm^{-1} . Nové filtry zkonstruované na bázi holografické optiky či zlepšené dielektrické filtry mohou efektivně odstranit intenzivní Rayleighovo záření. Druhým způsobem, jak eliminovat co nejvíce nežádoucího Rayleighova záření, je použití monochromátorů s dvojitou či trojitou monochromací (záření prochází přes dvě, resp. tři mřížky)⁸

1.5.3. Detektory

K detekci záření se původně používala fotografická deska, na níž se vyhodnocovaly polohy a intenzity jednotlivých čar; v současné době se používají fotonásobiče. Vzniklý proud se zesiluje a automaticky registruje. V simultánních spektrometrech je používána holografická mřížka a soubor fotodiod (diode-array) k současné registraci celého spektra nebo jeho vybrané části. Moderní přístroje využívají k vytvoření Ramanova spektra interferometru a Fourierovy transformace (FT-Raman spektrometrie). Excitace se s výhodou provádí zářením blízké infračervené oblasti. Hlavní předností FT spektrometrů je rychlost měření spekter, která umožňuje akumulaci spekter, a tím zvýšení signálu, který za normálních podmínek není příliš silný.²

Pro zpracování a detekci rozptýleného záření se v současné době obvykle využívají dva typy konstrukce Ramanova spektrometru. Při excitaci Ramanova efektu ve viditelné (případně ultrafialové) oblasti je využíván disperzní přístroj s mřížkovým spektrografem a „plošným“ (víceprvkovým – mnohokanálovým) CCD detektorem. Při registraci Ramanova rozptylu v blízké infračervené oblasti (NIR) je využíván interferometr a vysoce citlivý jednokanálový detektor. Pro získání vlastního spektra se zaznamenaný interferogram převádí Fourierovou transformací, takže se přístroj označuje jako FT Ramanův spektrometr.³

Při měření prvních Ramanových spekter se jako detektory používaly fotografická plátna, která byla schopná poměrně citlivě zaznamenávat při jedné expozici Ramanovo spektrum z určitého intervalu frekvencí. Na druhé straně však až do vyvolání nebylo jisté, zda optika a měření spektra bylo správně nastavené. Dalším krokem v používání detektorů v Ramanově spektroskopii byly tzv. jednobodové detektory v podobě fotonásobičů. Tato zařízení mění fotony s určitou diskrétní energií na elektrony. Získaný elektrický signál

z fotonásobiče umožňoval experimentátorům optimalizovat optické podmínky nastavení měření spektra. Na druhé straně však tato výhoda je limitovaná skutečností, že není možné získat celé Ramanovo spektrum v průběhu jediného integračního cyklu měření. Ramanovy přístroje s tímto detektorem musí celé spektrum postupně snímat po malých krocích a při každém z nich měřit intenzitu rozptýlených fotonů. To ale znamená, že změření celého Ramanova spektra vyžaduje značný čas. Řešením je zaznamenávání intenzity záření použitím nových elektronických prvků. Nejprve to byly fotodiodové pole, kamery a dnes CCD detektory. CCD detektor se sestává z dvojrozměrné matrice polovodičových elementů.⁸

1.5.4. Kyvety

Jako kyvet se využívá nádobek nejrůznějších tvarů. Pracuje-li se ve viditelné oblasti spektra, je materiálem pro kyvety libovolný druh skla. Užije-li se k excitaci čáry z ultrafialové oblasti spektra, je zapotřebí, aby záření procházelo křemenným materiálem. Pro práci při nízkých teplotách jsou nutné speciální kyvety s vakuovým pláštěm, který brání srážení vlhkosti na stěnách kyvety, zvláště na výstupním okénku. U nejmodernějších přístrojů jsou speciální zařízení dovolující pracovat při nízkých i vysokých teplotách. Objem kapalného vzorku činí několik mililitrů až jeden mikrolitr. Dají se zhotovovat i spektra monokrystalů a prášků.⁴

Důležitým aspektem umístění vzorku v kyvetovém prostoru je možnost jeho přesného polohování vůči excitujícímu paprsku a sběrné optice rozptýleného záření. Přístroje jsou obvykle vybaveny x-y-z polohovacím zařízením. Ať již manuálním ovládáním či s krokovými motory s řízením pomocí joysticku, tlačítek či ovládacího softwaru.³

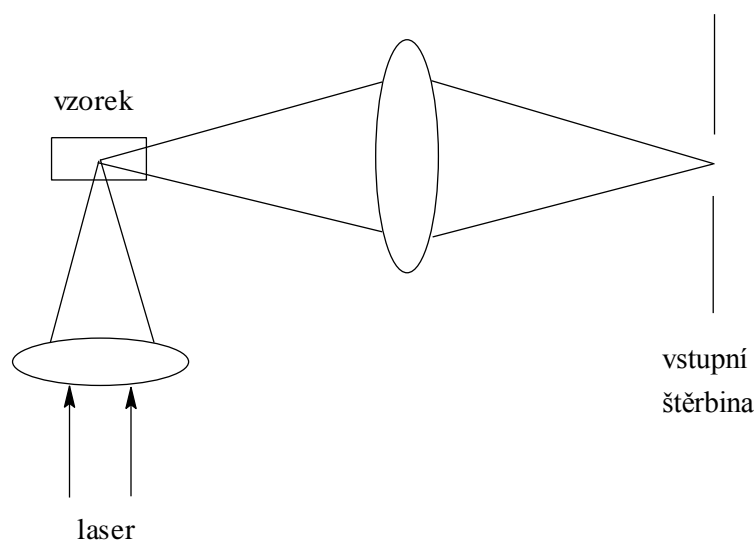
1.5.5. Požadavky na vzorek

Měření je možno provádět v plynném stavu, kdy se používají kyvety s násobným průchodem, i v pevném stavu (po rozdrcení na prášek umístěný v kapiláře nebo ve formě monokrystalů). Pro měření v kapalném stavu mají kyvety objem od 0,1 μ l. Proti dřívější době, kdy se používaly k ozáření vzorků výbojky a rozptýlené záření mělo malou intenzitu, takže bylo nutno pracovat s vysokou koncentrací vzorků, je v současné době možno provádět měření několika mg látek. Použitá rozpouštědla musí poskytovat slabé Ramanovy pásy,

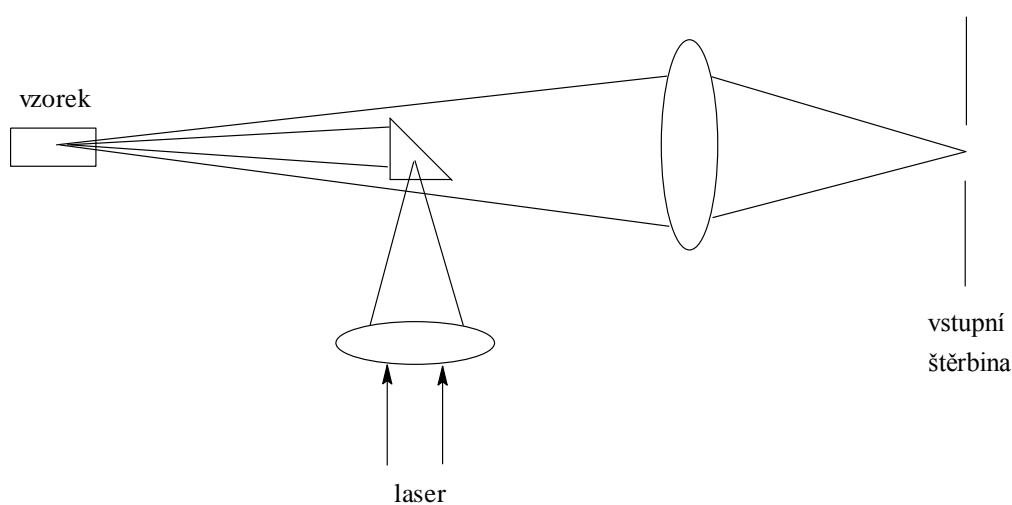
které nepřekrývají spektrum vzorku; tato rozpouštědla nemusí být bezvodá. Je možno pracovat také přímo ve vodných roztocích, což umožňuje použití Ramanovy spektrometrie proměření různých biologických materiálů.²

1.5.6. Možná uspořádání

Uspořádání kyvetového prostoru závisí na způsobu zpracování rozptýleného záření. Základními geometriemi vzorkové komory je 90° uspořádání (kolmá geometrie využívaná především pro měření kapalin) a geometrie 180° („back-scattering“ užívaná především pro měření pevných vzorků). Řada přístrojů umožňuje využít oba základní typy (viz obr. 7 a 8) excitační geometrie³.



Obrázek 7: 90° uspořádání⁸



Obrázek 8: 180° uspořádání⁸

180° geometrie poskytuje možnost kombinovat Ramanův spektrometr s optickým mikroskopem, což umožňuje Ramanovu analýzu velmi malých ploch vzorku.¹³

1.5.7. Aplikace metody

Ramanova spektroskopie slouží většinou v kombinaci s infračervenou spektroskopií ke strukturní analýze látek. Polohy Ramanových pásů i celá spektra jsou tabelovány v rozsáhlých sbírkách a ukládány v paměti počítačů.

Ramanova spektroskopie hraje důležitou roli při studiu a charakterizaci grafénových materiálů. Byla široce využívána v posledních čtyřiceti letech při charakterizaci pyrolytického grafitu, uhlíkových vláken, skelného uhlíku, fullerenu, uhlíkových nanotrubiček a grafénu. Ramanova spektroskopie nám dává informace o velikosti krystalů, hybridizaci a přítomnosti nečistot, hustotě, defektech, o počtu grafénových vrstev a podobně.¹⁶

Analýza vzorku pomocí vibrační mikrospektroskopie může být využita k mapování („mapping“) a zobrazování („imaging“). Mapování představuje postupné měření spektra přilehlých oblastí vzorku. Je toho dosaženo pomocí posouvání každé části vzorku do paprsku, fokusovaného do mikroskopu, a celý proces se opakuje, dokud nejsou všechny oblasti vzorku změřeny. Zobrazování, na druhé straně, vyžaduje, aby byl vzorek fokusován na detektor, kde je měřena intenzita záření procházející každou částí vzorku. Pokud je vzorek posouván pouze v jednom směru, nazýváme toto měření mapování. Když ale vzorkem hýbeme ve dvou směrech - nemůžeme tomu sice říkat zobrazování, jelikož spektrum není měřeno pomocí detektoru, ale mikroskopu - můžeme se spektrem zacházet, jako by bylo získáno pomocí detektoru při zobrazování.¹⁷ Tyto metody jsou používány např. při sledování nádorů tlustého střeva nebo mozku nebo při skenování kostí a diagnostice nemocí. Další využití mají tyto metody v lékařství při sledování různých buněk v lidském těle, či v zemědělství nebo farmaceutickém průmyslu.^{15,16}

1.6. SERS

1.6.1. Popis metody

Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy – SERS) je povrchově citlivá technika, která má za následek

zvýšení Ramanova rozptylu molekuly adsorbované na zdrsňeném povrchu kovu. Toto zvýšení Ramanova signálu molekuly může být řádově až 10^5 - 10^6 . SERS tedy využívá skutečnost, že Ramanův signál z molekuly adsorbované na povrchu některých kovů může být výrazně silnější než Ramanův signál z té samé molekuly. Přesná příčina takového výrazného zvýšení Ramanova záření je ještě stále předmětem diskuze, ale když intenzita rozptýleného Ramanova záření je úměrná druhé mocnině indukovaného dipólového momentu, jsou dvě možnosti: zvýšení polarizovatelnosti nebo zvýšení elektrického pole adsorbované molekuly.⁸

V prvním případě může zvýšení polarizovatelnosti nastat v důsledku efektu přenosu náboje nebo tvorby částečné chemické vazby mezi povrchem kovu a zkoumanou molekulou. V druhém případě se uvažuje interakce laserového paprsku s nepravidelnostmi na povrchu kovu. Předpokládá se, že laserový paprsek excituje vodivostní elektrony v povrchu kovu, což způsobuje lokální excitaci plasmonu na povrchu a zvýšení intenzity elektrického pole. V případě obou teorií je výběr vhodného povrchu kovu velmi důležitý. Nejrozšířenějším povrchem pro SERS je elektrochemicky upravený povrch stříbrné elektrody, ale používá se i koloidní stříbro a zlato s velikostí částic do 20 nm.⁹

Jednou z nevýhod SERS jsou těžkosti při interpretaci spekter. Zesílení signálu je tak dramatické, že Ramanovy pásy, které jsou velmi slabé či nepozorovatelné při konvenční Ramanově spektroskopii, se objeví v SERS. Též některé stopové příměsi mohou přispívat dodatečnými pásy. Na druhé straně, v důsledku chemické interakce s povrchem kovu, některé silné pásy v konvenčním Ramanově spektru nejsou vůbec viditelné v SERS spektru.⁸

Pro uvedené problémy při interpretaci SERS spekter byla vyvinuta povrchově zesílená rezonanční Ramanova spektroskopie (Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy – SERRS), která využívá efekty obou metod. Zvýšení Ramanova signálu v důsledku spolupůsobení SERS efektu a rezonančního Ramanova efektu může dosáhnout 10^{14} – 10^{15} -násobek zesílení konvenční Ramanovy spektroskopie. Hlavní výhodou SERRS je, že spektra jsou více podobná rezonančním Ramanovým spektrům, což umožňuje jejich lehčí interpretaci.⁸

1.6.2. Nanočástice

Pro měření povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie jsou používány k zesílení signálu nanočástice vzácných kovů. Vzácné kovy jsou nereaktivní, nedochází k jejich snadné oxidaci. Nejvíce je využíváno zlato a stříbro.

V biologických aplikacích je pro měření preferováno zlato. Má větší stabilitu povrchu a mnohem větší biokompatibilitu s mnoha molekulami. Dále se používají mincovní a tranzitní kovy (Pt, Ru, Rh, Pd, Fe, Co, Ni), ale jen pro výzkumné účely či pro specifické aplikace.¹⁸

V SERS jsou používány i jiné substráty, než jsou koloidní částice, jako jsou například zdrsňené elektrody, kovové filmy, atd. Ale kovové nanočástice jsou nejvíce využívané kvůli jejich snadné preparaci, jako je chemická redukce, laserová ablace a fotoredukce. Kovové nanočástice připravené konvenční redukcí jsou stabilní několik měsíců, či let, v závislosti na jejich skladování. Ke zvýšení stability nanočástic se například v biooblastech vědy používají nanočástice potažené křemíkem nebo hovžím sérovým albuminem.¹⁸

1.6.3. Aplikace SERS

Využití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie lze nalézt v lékařství a farmakologii např. k identifikaci léčiv a drog, k určení jejich kontaminace a interakce s jinými látkami.¹⁸

Další použití této metody je v životním prostředí a analýze jeho znečištění, v analyzování potravin. Před těmito analýzami někdy musí být provedena separace např. pomocí chromatografie. Tato metoda je také využívána kvůli tomu, že v Ramanově spektroskopii voda jako rozpouštědlo neabsorbuje záření, a může tedy být použito k měření vodných roztoků.¹⁸

Aplikaci tato metoda nachází také při separaci aminokyselin (např. tyrosinu a tryptofanu), nebo při identifikaci chlorofenolu.¹⁸

1.7. UV/Vis spektroskopie

Molekulová absorpční spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm.⁸

Látky, které absorbují záření s vlnovou délkou menší než 380 nm (ultrafialové), se jeví lidskému oku jako bezbarvé. Látky, které absorbují z bílého slunečního záření

vlnové délky v rozsahu 380 až 770 nm se oku jeví jako barevné. Oblast záření s vlnovou délkou menší než 200 nm se označuje jako vakuová ultrafialová oblast.⁸

Za normálních podmínek se molekula látky nachází v základním elektronovém stavu. Pohlcením energie záření z ultrafialové či viditelné oblasti elektromagnetického spektra přechází molekula do excitovaného stavu. Její setrvání v tomto energeticky bohatším stavu je krátké a přechází různými deexcitačními přechody (zářivými i nezářivými) za předání energie zpět do základního stavu. Tím je v absorbujícím systému udržována rovnováha odpovídající přebytku molekul v základním energetickém stavu.²

Absorpční přechody látky mohou probíhat z různých vibračních a rotačních stavů základního elektronového stavu molekuly do různých vibračních a rotačních stavů jejího excitovaného elektronového stavu. Protože energetické přechody mezi elektronovými stavy v molekule jsou mnohem náročnější na energii než přechody mezi stavy vibračními i rotačními, výsledná absorpce záření o energii dostatečně velké pro přechody elektronů současně znamená excitaci i vibračních a rotačních hladin molekuly. Výsledné absorpční spektrum látky je pásové, protože při jeho registraci jednotlivé přechody zpravidla splývají.²

Poloha absorpčních pásů v ultrafialové a viditelné spektroskopii je dána absorbovanou energií při elektronovém přechodu a souvisí se strukturou látky. Je charakteristická pro část molekuly (chromofor) a je ovlivněna substituenty i použitým rozpouštědlem. Identifikace látky jenom podle získaného absorpčního spektra v ultrafialové a viditelné oblasti však obvykle není jednoznačná. Nicméně použití atlasů spekter společně s aplikací základních pravidel pro absorpci záření molekulami a za využití dat získanými jinými metodami umožňuje identifikaci látek.²

Pomocí UV/Vis spektroskopie jsme měřili v rámci této bakalářské práce, abychom zjistili, zda jsme nebo nejsme v rezonanci s vlnovou délkou použitého laseru. Mimo rezonanci měříme konvenční Ramanův rozptyl. V rezonanci s vlnovou délkou 532 nm měříme rezonanční Ramanův rozptyl.

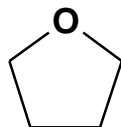
1.8. Měření látky

1.8.1. Voda

Voda má v Ramanově spektroskopii tu výhodu, že díky malému účinnému průřezu, nedochází k absorpci záření, a tím k zeslabení signálu vlastní látky,

kteřou ve vodném roztoku měříme. Samotná voda samozřejmě má pozorovatelné vibrační pásy, a to dvě valenční (symetrickou a asymetrickou) a jednu deformační.

1.8.2. Tetrahydrofuran

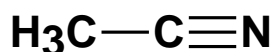


Obrázek 9: Tetrahydrofuran

Tetrahydrofuran (THF) je heterocyklická sloučenina, bezbarvá kapalina, zapáchající po ethylenetheru; mísí se v každém poměru s vodou. Používá se v kombinaci s jinými rozpouštědly (ketony) k rozpouštění vinylových hmot, při výrobě kyseliny adipové, jantarové apod. Tetrahydrofuran se připravuje destilací butandiolu s malým množstvím kyseliny sírové.¹⁹

Tetrahydrofuran byl měřen pro charakteristický cyklus, kterým je tvořen. Jeho charakteristická vibrace by se měla nacházet okolo 915 cm^{-1} . Dále budou ve spektru pozorovány valenční a deformační vibrace CH vazeb.

1.8.3. Acetonitril



Obrázek 10: Acetonitril

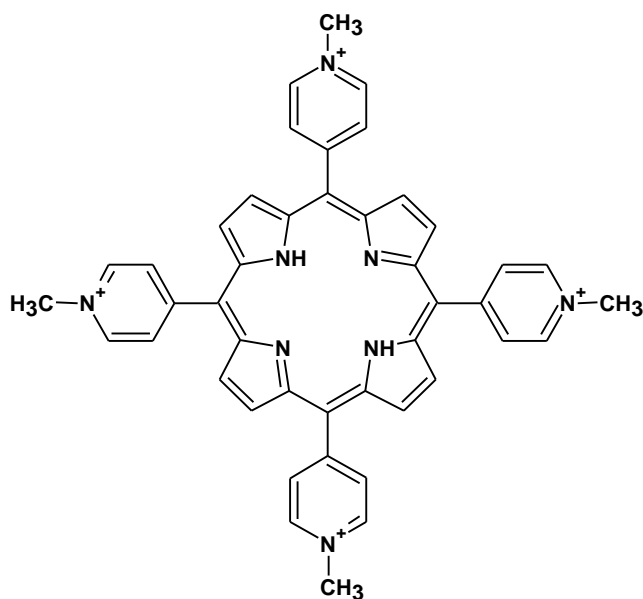
Acetonitril se nejčastěji získává jako vedlejší produkt při výrobě akrylonitrilu. Acetonitril má kyanidový účinek, ale i účinky narkotické.²⁰

Acetonitril obsahuje skupinu $-\text{C}\equiv\text{N}$, jejíž charakteristická vibrace by se měla nacházet v oblasti $2270\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$. Protože jde opět o organickou sloučeninu, budou rovněž vibrace CH vazeb patrné ve spektru Ramanova rozptylu.

1.8.4. Nanočástice vzácných kovů (Ag, Au)

Zlaté a stříbrné nanočástice v podobě koloidních roztoků, připravené redukcí zlatité či stříbrné soli borohydridem sodným, byly použity pro měření povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie vybrané organické sloučeniny, kterou byl níže uvedený porfyrin.

1.8.5. Kationtový ve vodě rozpustný porfyrin



Obrázek 11: Kationtový ve vodě rozpustný porfyrin

Zvolený kationtový porfyrin (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-21H, 23H-porfin, tetratosylátová sůl (TMPyP)) byl měřen pro účely rezonanční Ramanovy spektroskopie (RRS) a povrchem zesílené rezonanční Ramanovy spektroskopie (SERRS). Obecně porfyriny jsou cyklické sloučeniny tvořené spojením 4 pyrrolových kruhů methenylovými můstky. Jejich charakteristickou vlastností je tvorba komplexů s kovovými ionty vázanými k dusíkovému atomu pyrrolových kruhů. Příkladem porfyrinů obsahujících železo je hem v hemoglobinu, porfyrinů obsahujících hořčík je chlorofyl, fotosyntetické barvivo rostlin. V přírodě jsou methaloporfyriny konjugované s proteiny a vzniká tak řada sloučenin důležitých v biologických procesech. Jsou to hemoglobiny, myoglobiny, cytochromy, katalasy a tryptofanpyrrolasa.²¹

Porfyriny jsou barevné. Při studiu porfyrinu a jejich derivátů jsou důležitá charakteristická spektra ve viditelné i ultrafialové oblasti. Za pozornost stojí výrazný absorpční pás u 400 nm. Ten je významným rysem porfyrinového kruhu a je charakteristický pro všechny porfyriny bez ohledu na postranní řetězec. Tento pás byl označen Soretův, po svém objeviteli.²¹

Když jsou porfyriny rozpuštěné v kyselinách nebo organických rozpouštědlech osvětlovány ultrafialovým světlem, emitují silnou fluorescenci v červené oblasti. Tato fluorescence je tak charakteristická, že je často používána k detekci velmi malých množství volných porfyrinu. Za charakteristickou

absorpci i fluorescenci těchto látek jsou odpovědné dvojně vazby spojující pyrrolové kruhy. Zajímavou aplikací fotodynamických vlastností porfyrinu je jejich možné využití při léčení některých typů rakoviny. Postup je nazýván nádorová fototerapie. Tumory často přijímají více porfyrinů než normální tkáň. Hematoporfyrin nebo příbuzná látka je podána pacientovi s některým druhem tumoru. Poté je nádor ozářen argonovým laserem, který excituje porfyriny za vzniku cytotoxického efektu.²¹

2. Experimentální část

2.1. Přístroje

Měření byly prováděny na dvou odlišných Ramanových spektrometrech. Jeden se nachází na Přírodovědecké fakultě a druhý na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Všechna měření byla prováděna v leštěné pěti okénkové křemenné kyvetě. Objem vzorku byl vždy 2 ml.

2.1.1. Spektrometr na Přírodovědecké fakultě (PřF)

K měření Ramanových spekter na Přírodovědecké fakultě byl použit přístroj Thermo Scientific DXR Raman Microscope. Tento spektrometr má 180° uspořádání. Vlnová délka se dá nastavit na 780 nm, 633nm a 532 nm. Při vlnové délce 532 nm je schopný měřit spektra od 50 do 3500 cm^{-1} , citlivost (signál:šum) přístroje udávána výrobcem je 1000:1.

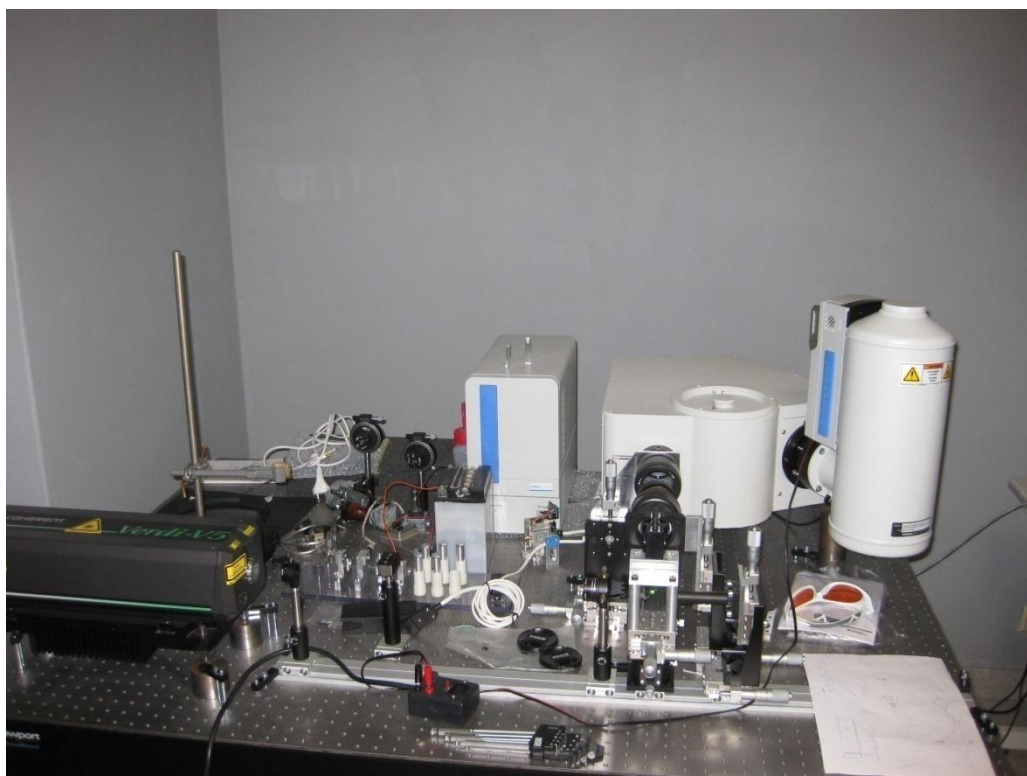
532 nm laser je polovodičový diodový laser. Jeho maximální výkon je 10 mW. Přístroj dále obsahuje filtr, který eliminuje Stokesovy linie. Detektor je chlazený termoelektricky na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (223,15 K). Všechny parametry spektrometru jsou nastavitelné pomocí softwaru v PC. Kalibrace přístroje probíhá pomocí softwaru na Ramanovo spektrum polystyrenu. Tento přístroj může být použit pro měření kapalných, ale i pevných vzorků.



Obrázek 12: Thermo Scientific DXR Raman Microscope

2.1.2. Spektrometr na Lékařské fakultě (LF)

K měření Ramanových spekter na Lékařské fakultě byl použit variabilní spektrometr upevněný na optickém stole. Využívá diodový laser Verdi o vlnové délce 532 nm, maximální výkon laseru je 2 W. Měření probíhalo při 10 mW a 100 mW. Uspořádání na LF je 90°. K fokusaci paprsku jsou použity dva objektivy a čočka. Dále paprsek vstupuje na mřížku. Přístroj má tři různé mřížky. Detektor je chlazen kapalným dusíkem.



Obrázek 13: Ramanův spektrometr na LF

2.2. Nastavení spektrometrů

Tabulka 2: Nastavení spektrometrů

parametr	PřF	LF
λ	532 nm	532 nm
výkon laseru	10 mW	10 mW, 100 mW
mřížka	900 vrypů/mm	600 vrypů/mm
mikrons slit	50	50
načítání signálu	2s expozice 60x	2s expozice 60x
teplota detektoru	223,15 K	100 K (kapalný N ₂)

2.3. Chemikálie

Ramanovou spektrometrií byla měřena vybraná rozpouštědla a roztoky nanočástic Ag u Au, či tyto koloidní roztoky v kombinaci s porfyrinem. Voda byla

použita destilovaná. Acetonitril pocházel od firmy Fluka (LC-MS Chromasolv®). Tetrahydrofuran byl zakoupen u firmy Sigma-Aldrich ($\geq 99.9\%$, Chromasolv®Plus, pro HPLC). Zlaté nanočástice připravila Bc. Magdaléna Bryksová v rámci své diplomové práce a jejich průměrná velikost je 10 nm. Stříbrné nanočástice připravila rovněž Bc. Magdaléna Bryksová v rámci své diplomové práce a jejich průměrná velikost je 12 nm. Porfyrin 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-21H, 23H-porfin, tetratosylátová sůl (TMPyP) pochází od firmy Aldrich.

2.4. Použitý software

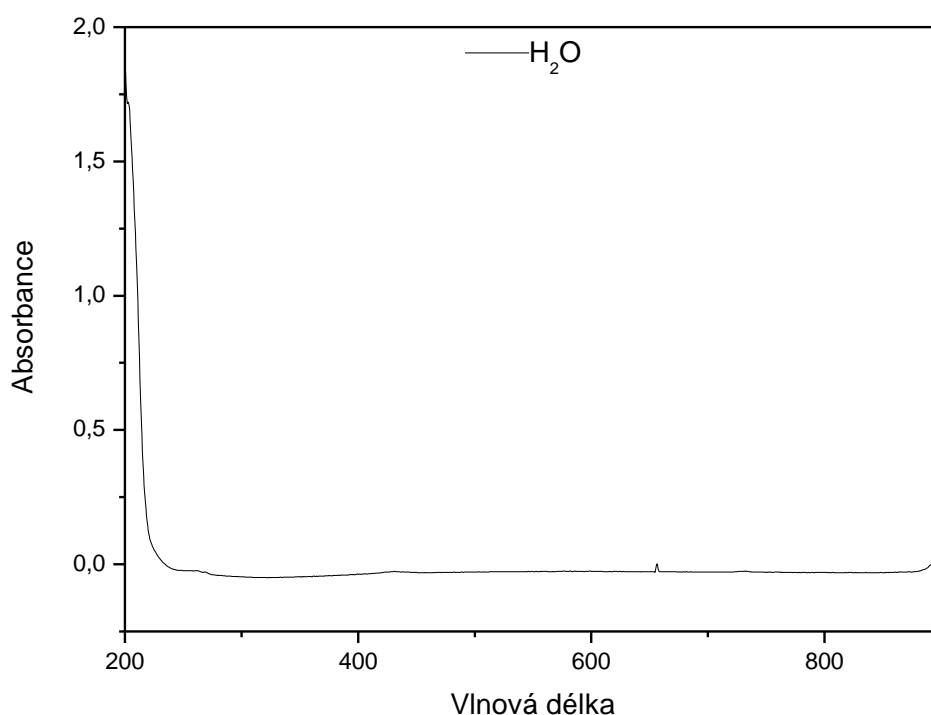
Pro vyhodnocování a zpracování spekter byl použitý software OriginPro 7.0

3. Výsledky a diskuse

Ke srovnání dvou různých Ramanových spektrometrů byla vybrána následující rozpouštědla: voda, acetonitril a tetrahydrofuran. Pro měření rezonančního Ramanova rozptylu byl měřen porfyrin a pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie zlaté a stříbrné koloidní roztoky. Jejich kombinace s porfyrinem pak dávala signály povrchem zesíleného rezonančního Ramanova rozptylu.

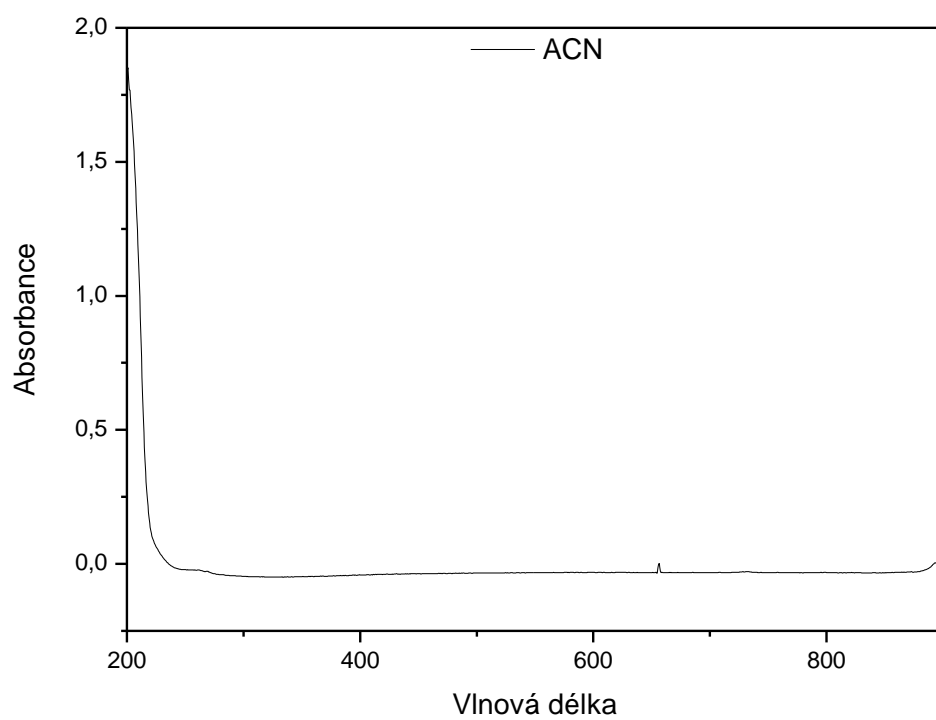
Nejprve byly všechny měřené látky změřeny pomocí UV/Vis spektrometru, abychom zjistili, zda jsme nebo nejsme v rezonanci s vlnovou délkou laseru 532 nm a prokázali tak možnost rezonančního zesílení signálu Ramanova rozptylu.

Voda se vyznačuje malým účinným průřezem pro Ramanův rozptyl, takže můžeme měřit i vodné roztoky sloučenin, na rozdíl od infračervené spektroskopie. S ohledem na nepřítomnost jakéhokoliv absorpčního pásu v UV/Vis spektru vody (obr. 14), měříme u vody Ramanův rozptyl.

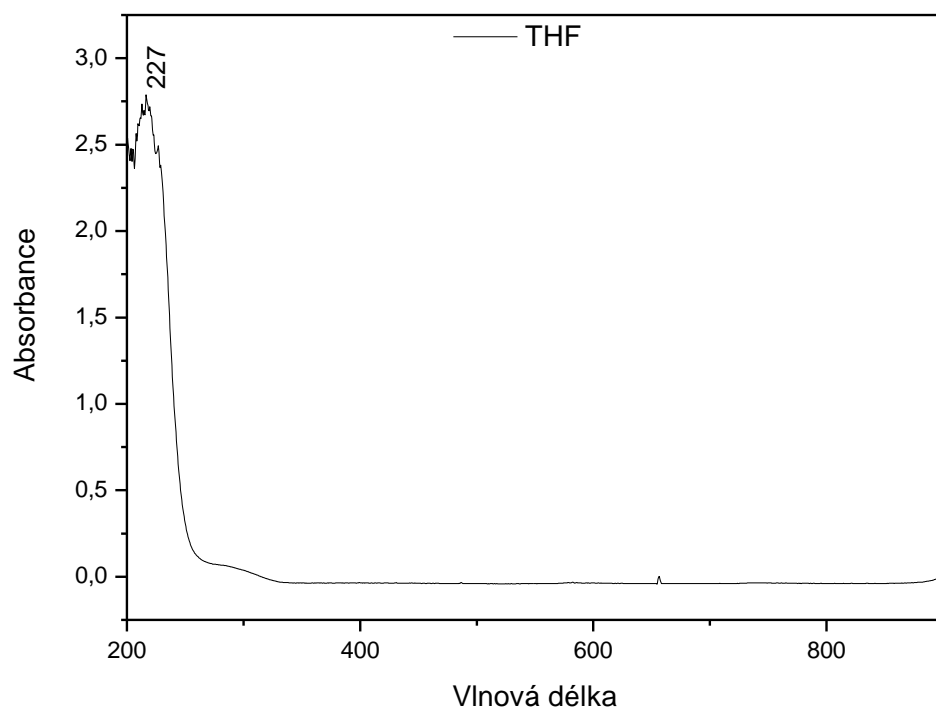


Obrázek 14: UV/Vis spektrum vody

U acetonitrilu a tetrahydrofuranu měříme také pouze Ramanův rozptyl s ohledem na průběh jejich UV/Vis spekter (viz obr. 15 a 16).

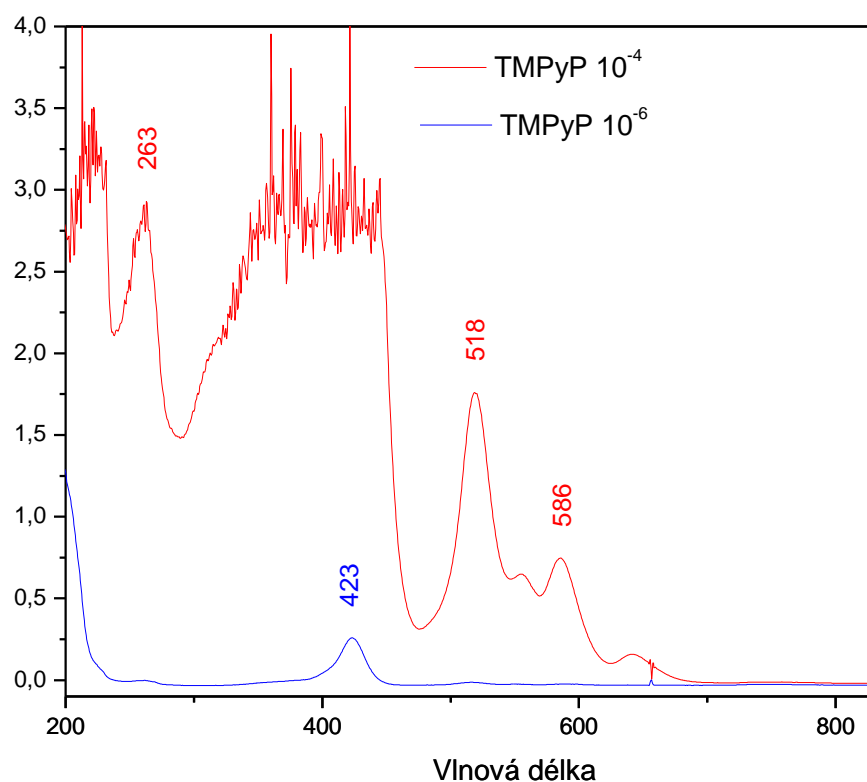


Obrázek 15: UV/Vis spektrum acetonitrilu



Obrázek 16: UV/Vis spektrum tetrahydrofuranu

Kationový porfyrin, který je dobře rozpustný ve vodě, byl měřen jako modelová sloučenina pro účely rezonanční Ramanovy spektroskopie. Proměřili jsme jeho UV/Vis spektrum v koncentracích 1×10^{-4} mol/l a 1×10^{-6} mol/l (obr. 17), aby bylo zřejmé, že jde o chromofor s nejvyšší absorbcí u 423 nm. Vyšší koncentrace vedla v oblasti Soretova pásu k přesycení detektoru, ale poskytla cennou informaci o absorpci vzorku v oblasti excitační vlnové délky laseru používaného na obou sestavách (532 nm). Nižší koncentrace byla měřena pro vizualizaci Soretova pásu a určení jeho přesné pozice.

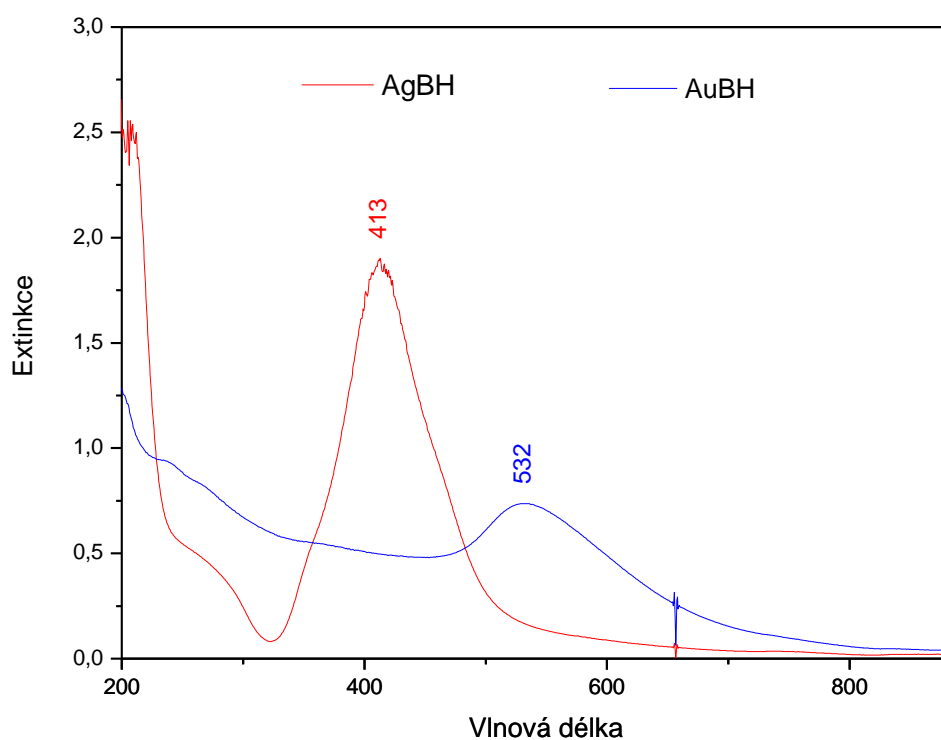


Obrázek 17: UV/Vis spektrum porfyrinu

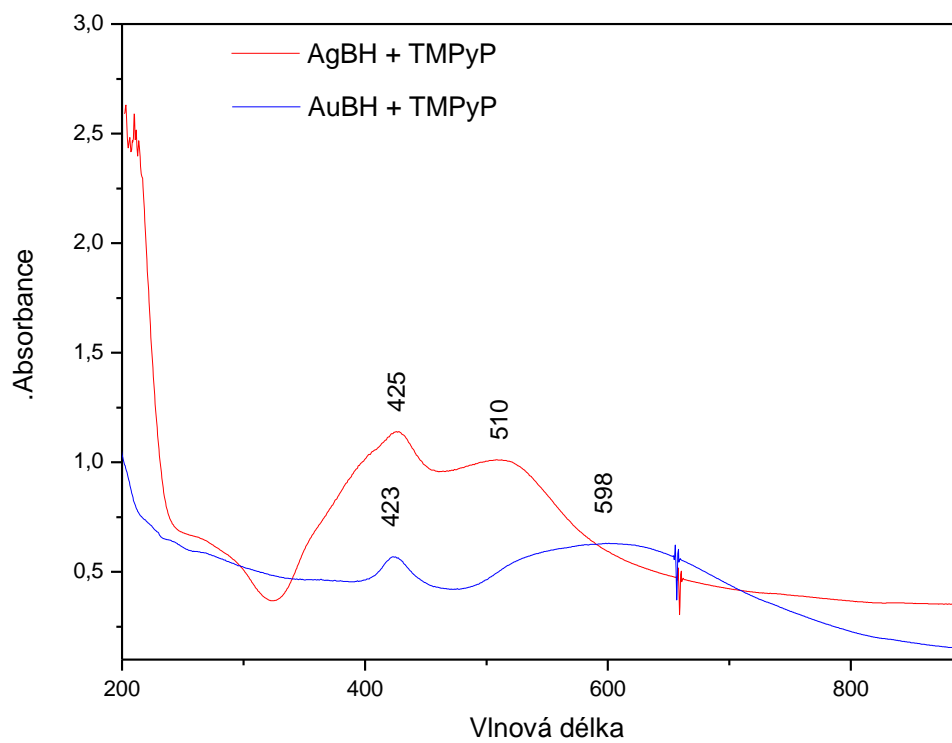
U nanočástic stříbra a zlata měříme pomocí UV/Vis spektroskopie intenzitu extinkce, což je součet absorpce a rozptylu, povrchového plasmonu (obr. 18). Je zřejmé, že zatímco stříbrné nanočástice vykazují povrchový plasmon s maximem extinkce v oblasti 413 nm, zlaté koloidní roztoky poskytují maximum extinkce u 532 nm. Dá se čekat, že především v případě zlatých nanočástic budeme při excitaci 532 nm v rezonanci s povrchovým plasmonem, a budou tedy měřena SERS spektra. V případě stříbrných nanočástic musí nejprve dojít k agregaci nanočástic, tím posunu

plasmonové extinkce a následnému zesílení Ramanova rozptylu vlivem povrchu nanočástic. K agregaci nanočástic dojde vlivem přidavku roztoku kationového porfyriu (obr. 19). Jelikož už víme, že i porfyrin je v rezonanci s excitační vlnovou délkou laseru, tak se bude jednat o měření povrchem zesíleného rezonančního Ramanova rozptylu (SERRS). Opakující se pík ve všech spektrech v oblasti 650 cm^{-1} je chyba detektoru.

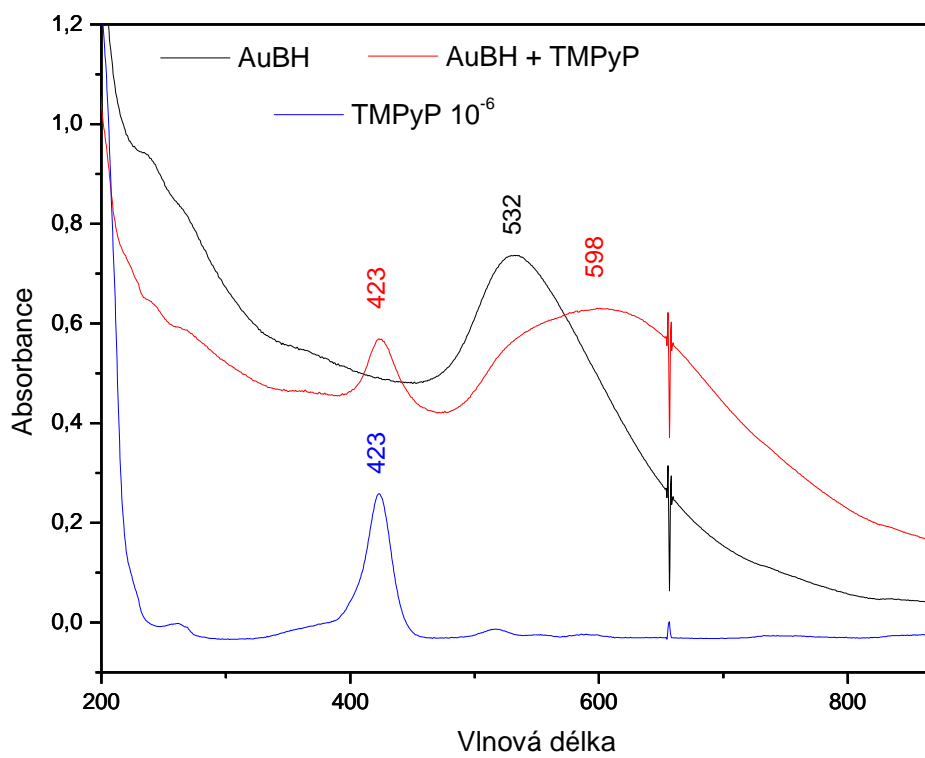
Srovnání intenzit extinkce nanočástic s porfyriem a bez něj se nachází v obrázcích 20 a 21. Ozřejmuje tak výskyt pásu v oblasti 423 nm pocházejícího od Soretova pásu porfyriu. Široký pás nacházející se vpravo od Soretova pásu v každém ze spekter systémů nanočástic s porfyriem pak pochází od agregovaných nanočástic Au (obr. 20) a Ag (obr. 21).



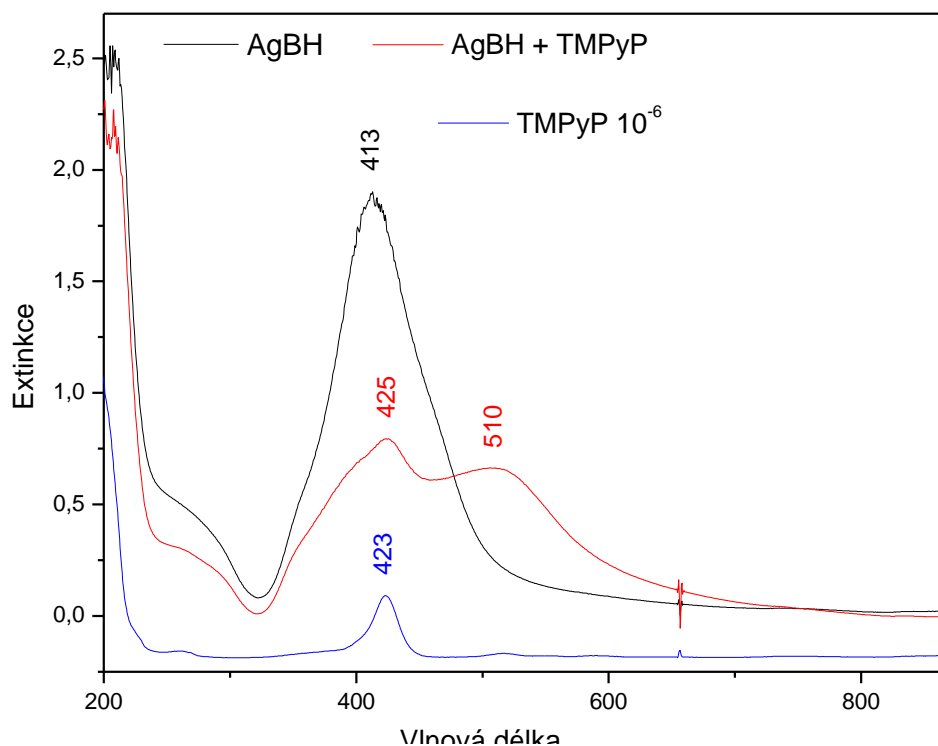
Obrázek 18: UV/Vis spektrum AgBH a AuBH



Obrázek 19: UV/Vis spektrum AgBH a AuBH s porfyrinem



Obrázek 20: UV/Vis spektrum zlata s porfyrinem a bez něj



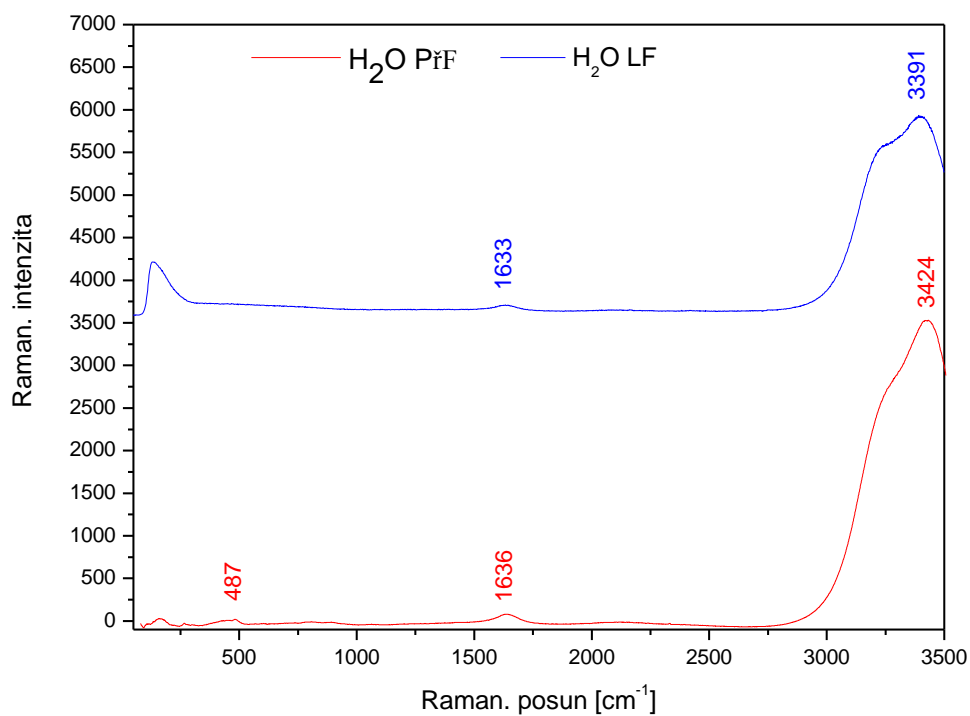
Obrázek 21: UV/Vis spektrum stříbra s porfyrimem a bez něj

Všechny látky změřené na obou spektrometrech srovnáme a u jednoho zvoleného pásu (který je, pokud možno, izolovaný a umožňuje tak snadnou kvantifikaci intenzity oproti hodnotě šumu z pozadí) vypočítáme poměr SNR (Signal to Noise Ratio) – poměr signálu k šumu. Tato charakteristika spektra nám řekne, který spektrometr měří kvalitativně lépe při dodržení stejného nastavení.

Uvedená spektra Ramanova či povrchem zesíleného Ramanova rozptylu jsou spojená z Přírodovědecké a Lékařské fakulty. Jednotlivá spektra je možno nalézt v přílohách. V přílohách je rovněž pro zájemce uvedeno srovnání spekter měřených na Lékařské fakultě při výkonu laseru 10 mW a 100 mW. Nutno podotknout, že Ramanův posun na ose x je rozdílný, zvláště na okrajích spektra, pro obě sestavy. To je způsobeno poněkud chybnou kalibrací u sestavy na LF, kde následná recalibrace pomocí externího programu selhala a v době měření a vyhodnocování této bakalářské práce nefungovala. Oproti tomu, kalibrace u sestavy na PřF je prováděna hned před měřením a hodnoty Ramanova posunu pro příslušné látky jsou v souladu s dříve určenými spektry pro příslušné látky v literatuře.

U spektra vody odpovídají vlnočty kolem 3400 cm⁻¹ valenčním vibracím a v oblasti kolem 1600 cm⁻¹ deformační vibraci (viz obr. 22). Ze srovnání spekter

z obou sestav je patrné, že na lékařské fakultě získáme spektrum o mnohem větší intenzitě. Ale označení pásů (patrné zvláště u valenčních vibrací) je u sestavy na LF posunutě s ohledem na výše zmíněné problémy s kalibrací.



Obrázek 22: Ramanovo spektrum vody na PřF a LF

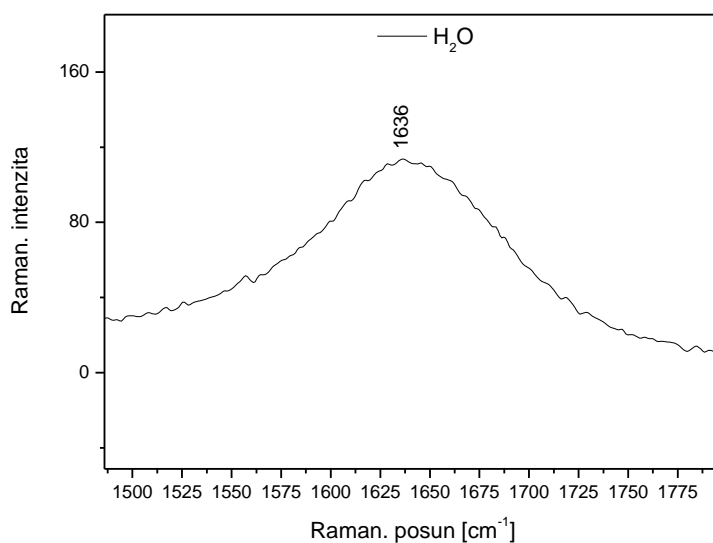
SNR pro vodu na PřF počítáme pro deformační pás 1636 cm^{-1} . V obou spektrech je vidět celý pás (viz obr. 23).

$SNR = \frac{I_a}{I_{\check{s}_a}}$, kde I je intenzita vlastního píku a $I_{\check{s}}$ je intenzita šumu poblíž vlastního píku

studované molekuly.

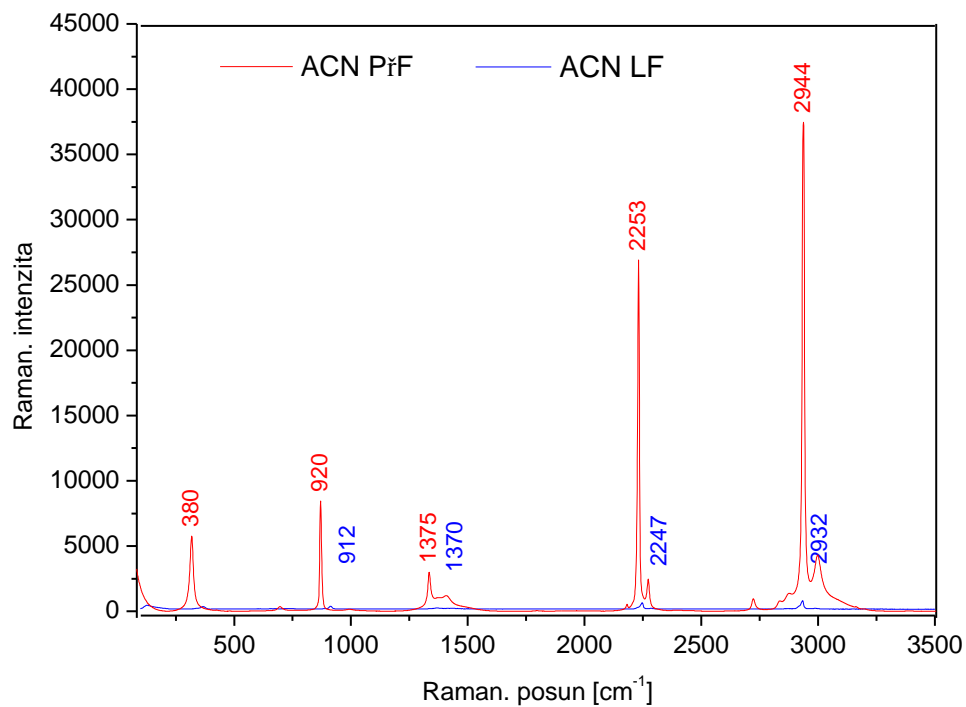
$$\text{PřF: } SNR_{H_2O} = \frac{75}{8} = 9,4$$

$$\text{LF: } SNR_{H_2O} = \frac{40}{7} = 5,7$$



Obrázek 23: Přibližný deformační pás vody na PřF

Ve spektru acetonitrilu budeme SNR počítat pro charakteristický pás 2253 cm⁻¹, který odpovídá valenční vibraci -CN skupiny (viz obr. 24). Je dostatečně úzký a v jeho okolí (směrem k nižším vlnočtům) se nevyskytuje žádný pás. Lze tudíž s dobrou aproximací odečítat jak intenzitu tohoto signálu, tak intenzitu šumu z této části a určit SNR.

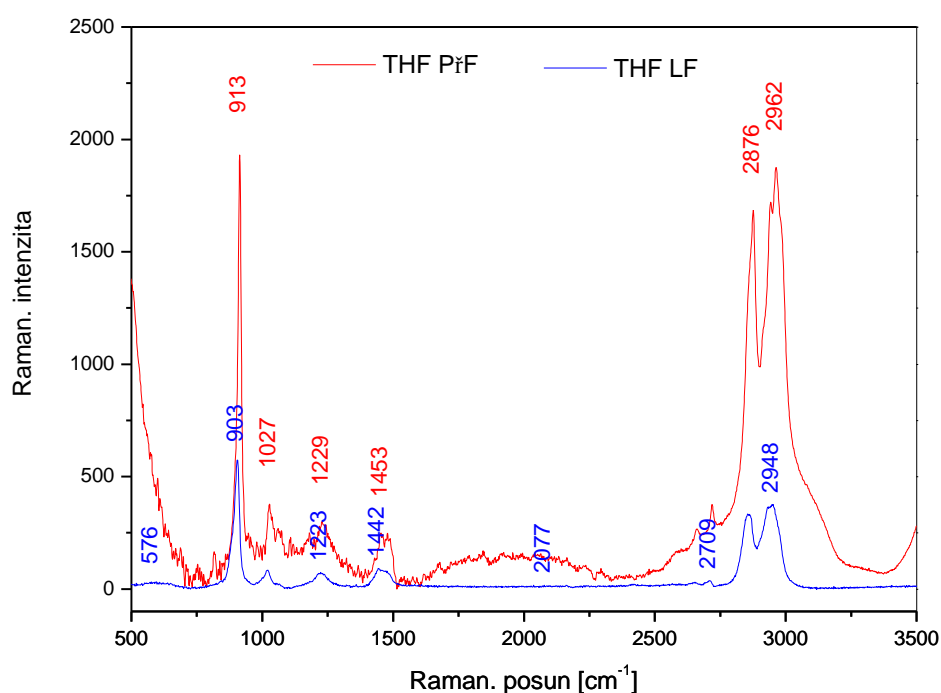


Obrázek 24: Ramanovo spektrum acetonitrilu

$$\text{PřF: } SNR_{ACN} = \frac{24500}{300} = 81,6$$

$$\text{LF: } SNR_{ACN} = \frac{460}{11} = 41,8$$

SNR pro tetrahydrofuran budeme počítat pro charakteristický pás v oblasti 913 cm^{-1} , který náleží vibraci cyklu. Tento pás je nejužší a bude nejmenší chyba při posouzení signálu k šumu na základě intenzity pásu (viz obr. 25).



Obrázek 25: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu

$$\text{PřF: } SNR_{THF} = \frac{1900}{65} = 29,2$$

$$\text{LF: } SNR_{THF} = \frac{525}{10} = 52,5$$

Porfyrin se bohužel podařilo změřit jen na Lékařské fakultě, není tedy srovnání s přístrojem na Přírodovědecké fakultě. V případě měření porfyrinu na LF je také vidět, že při výkonu laseru 100 mW dochází k přesycení detektoru Ramanova spektrometru (viz obr. 57 v příloze). SNR měříme pro pík 2934 cm^{-1} (viz obr. 26).

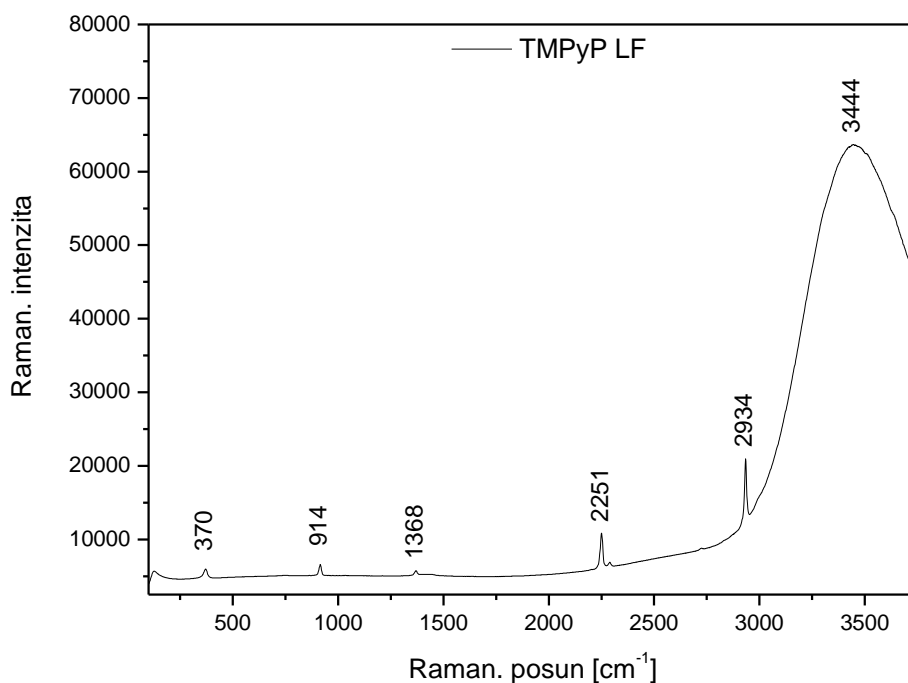
$$\text{LF: } SNR_{TMPyP} = \frac{4800}{300} = 16$$

SNR pro stříbrné nanočástice počítáme pro deformační pás 1627 cm^{-1} (viz obr. 27).

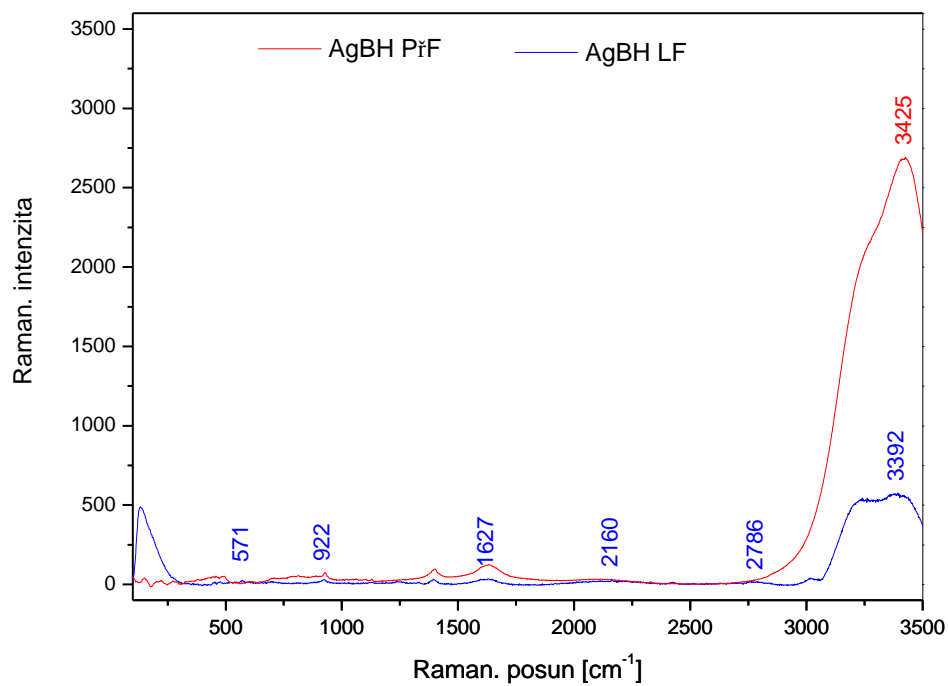
$$\text{PřF: } SNR_{AgBH} = \frac{75}{5} = 15$$

$$\text{LF: } SNR_{AgBH} = \frac{30}{8} = 3,75$$

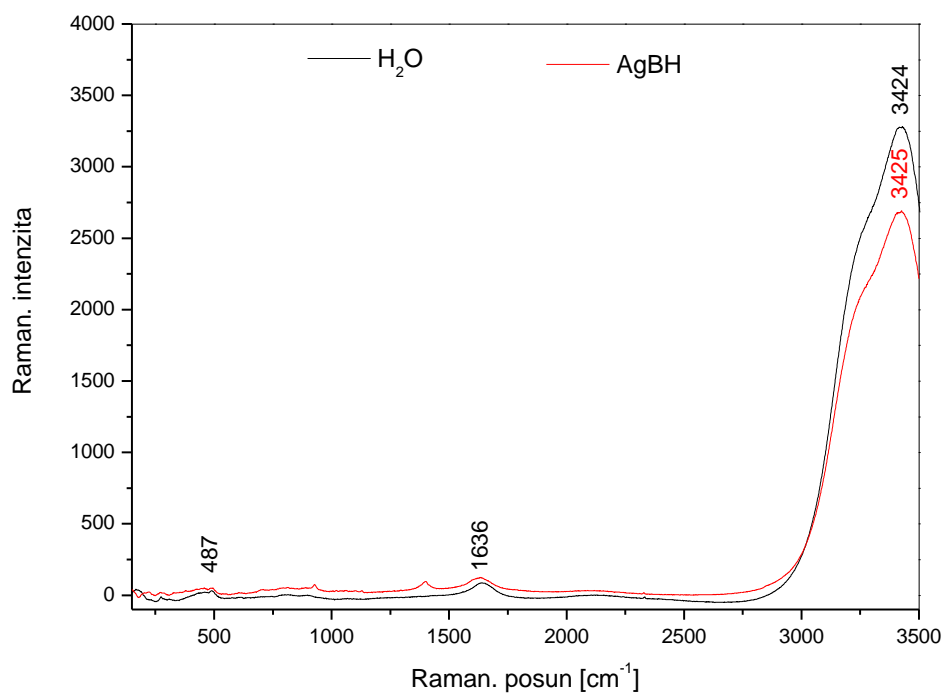
V porovnání s Ramanovým spektrem čisté vody je ve spektru AgBH vidět nejen příspěvek vody, ale i náznak pásů borátů (viz obr. 28). Signál vody je ve vodném roztoku AgBH částečně potlačen (obr. 28), což může být způsobeno tím, že boráty jsou blíže povrchu nanočástic a molekuly vody až ve vzdálenější vrstvě. Nedochozí tak k zesilování signálu molekul vody vlivem nanočástic. Navíc, díky přítomnosti stříbrných nanočástic dojde k alespoň částečné absorpci dopadajícího záření (o čemž svědčí UV/Vis spektrum AgBH – obr. 18, extinkce 0,2 u 532 nm), čímž je opět zmenšen příspěvek Ramanova rozptylu vody v celkovém signálu.



Obrázek 26: Ramanovo spektrum porfyriu



Obrázek 27: Ramanovo spektrum AgBH



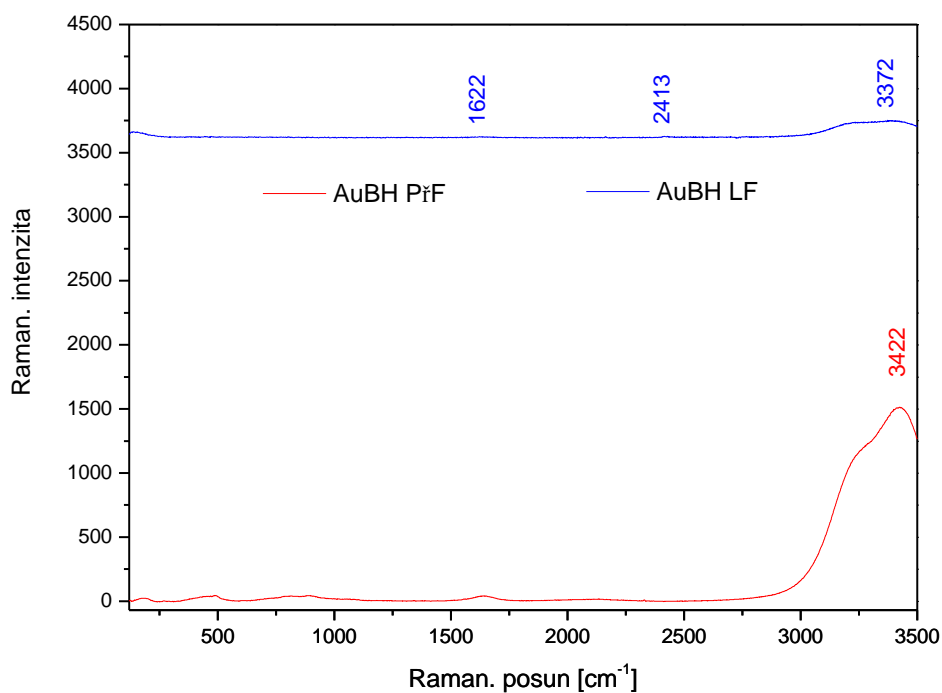
Obrázek 28: Srovnání AgBH a vody na P̄F

SNR pro zlaté nanočástice počítáme pět v oblasti deformační vibrace vody, tzn. 1622 cm^{-1} , neboť se tento pík objevuje v obou spektrech (viz obr. 29).

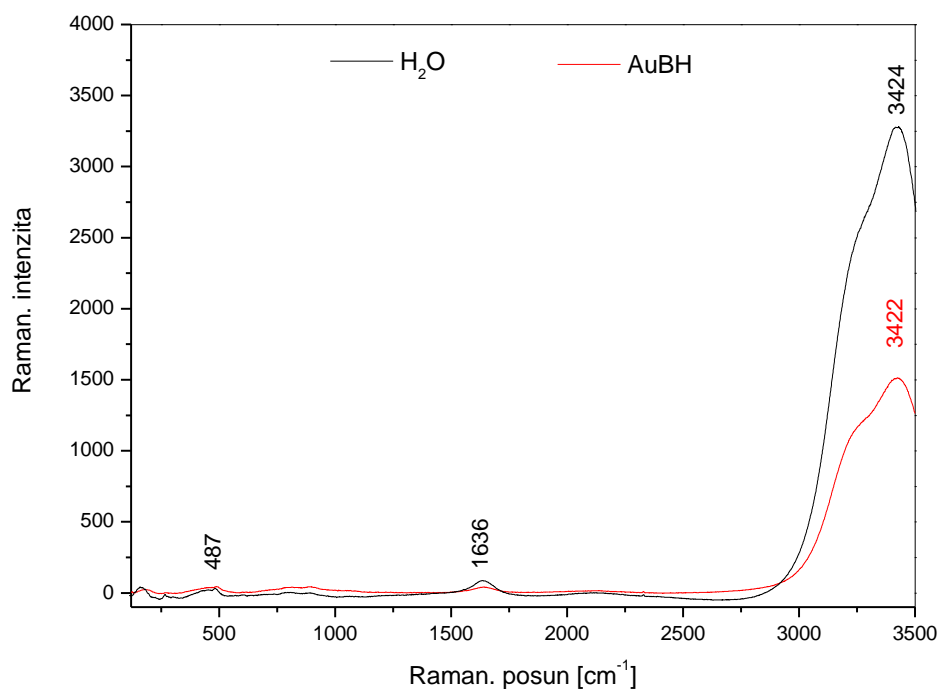
$$\text{PřF: } SNR_{AuBH} = \frac{33}{3} = 11$$

$$\text{LF: } SNR_{AuBH} = \frac{9}{5} = 1,8$$

Je pozoruhodné, že u zlatých nanočástic, na rozdíl od stříbrných nanočástic, je evidentní ve spektru pouze signál vody a nikoliv borátů (viz obr. 30). Porovnání Ramanova spektra čisté vody se spektrem vodného roztoku zlatých nanočástic na téže sestavě (např. PřF UP – obr. 30) ukazuje, že vlivem zlatých nanočástic, jejichž maximum extinkce se nachází právě u excitační vlnové délky laseru (jak bylo prokázáno měřením UV/Vis spekter – obr. 18, 20), dojde k částečné absorpci záření, jak dopadajícího, tak i rozptýleného, a tudíž je signál Ramanova rozptylu méně intenzivní pro vodu ve vodném roztoku těchto nanočástic.



Obrázek 29: Ramanovo spektrum AuBH



Obrázek 30: Srovnání AuBH a vody na PřF

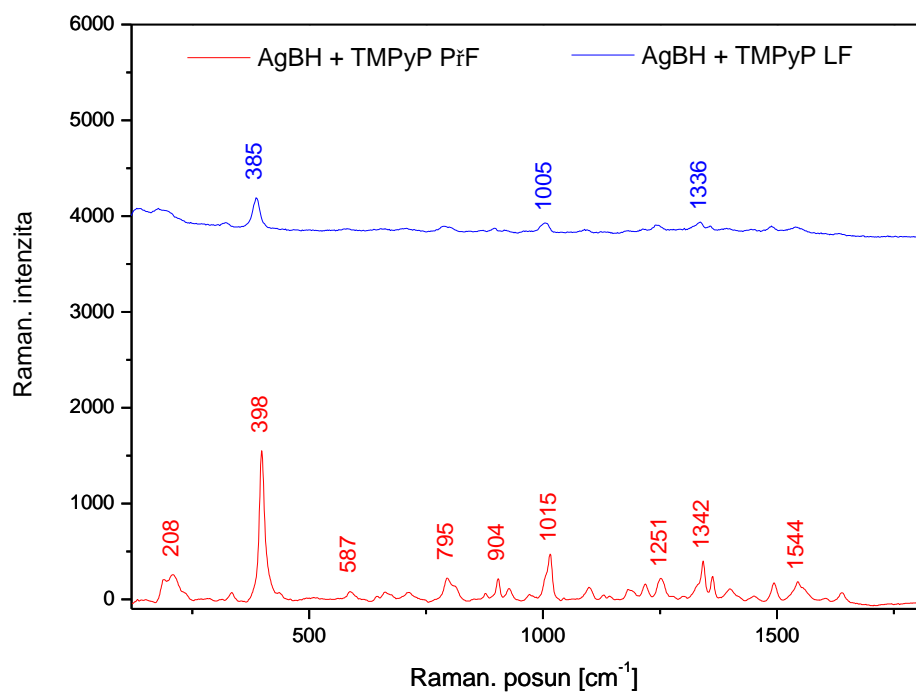
SNR pro AgBH s porfyrinem budeme počítat v oblasti 398 cm^{-1} (viz obr. 31). Ve spektru jsou vidět charakteristické metalační markery metalovaného porfyriu ($398, 1015, 1342, 1544 \text{ cm}^{-1}$).^{22,23}

$$\text{PřF: } SNR_{AgBH+TMPyP} = \frac{1500}{12} = 125$$

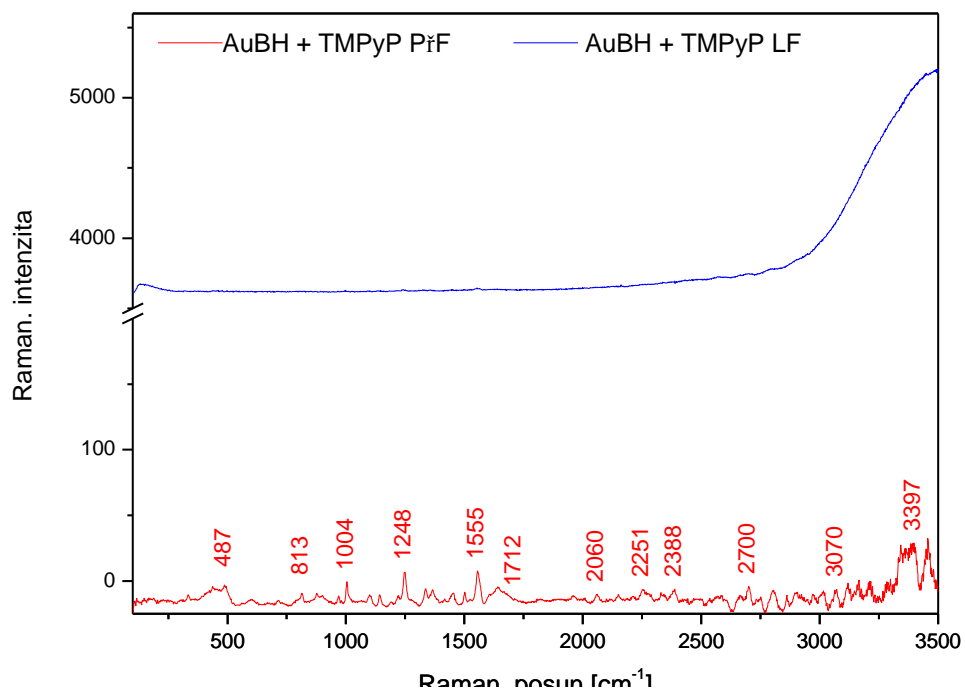
$$\text{LF: } SNR_{AgBH+TMPyP} = \frac{275}{15} = 18,3$$

SNR pro AuBH s porfyrinem na PřF počítáme v oblasti 1004 cm^{-1} , na LF není vidět žádný pás zřetelně (viz obr. 32). SERRS spektrum je daleko méně intenzivní u AuBH-TMPyP než u AgBH-TMPyP, protože v případě zlatých nanočástic nedochází k metalaci porfyriu, v důsledku čehož se nepřiblíží porfyrin tolik k povrchu nanočástic a nemůže být tolik zesílen jeho Ramanův rozptyl.

$$\text{PřF: } SNR_{AuBH+TMPyP} = \frac{38}{3} = 12,6$$



Obrázek 31: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem



Obrázek 32: Ramanovo spektrum AuBH s porfyrinem

Pro názornější srovnání zapíšeme vypočtené SNR do tabulky (viz tab. 3):

Tabulka 3: SNR měřených látek

látka	SNR	
	PřF	LF
H₂O	9,4	5,7
ACN	81,6	41,8
THF	29,2	52,5
TMPyP	–	16
AgBH	15	3,75
AuBH	11	1,8
AgBH + TMPyP	125	18,3
AuBH + TMPyP	12,6	–

Téměř vždy je lepší poměr signálu a šumu na Ramanově spektrometru na Přírodovědecké fakultě, kromě tetrahydrofuranu. Na PřF je také snadnější kalibrace a seřízení optiky. Ale na Lékařské fakultě je mnohem větší variabilita měření vzorků – pevné i kapalné, možno i měření pomocí termostatu. Je také větší variabilita nastavení výkonu laseru.

Z tabulky 3 je patrné, že téměř vždy, kromě tetrahydrofuranu, je lepší poměr signálu k šumu na Ramanově spektrometru na Přírodovědecké fakultě. U vody je poměr SNR srovnatelný na obou sestavách. Tyto rozdíly (lepší SNR na PřF u ACN, zatímco horší SNR na PřF u THF a srovnatelný SNR na PřF a LF u vody) si vysvětlujeme jednak rozdílným charakterem látek, jednak rozdílnou geometrií uspořádání Ramanových spektrometrů. Neboť na PřF je detekován zpětný rozptyl, zatímco na LF jde o 90° uspořádání.

Absolutní hodnoty SNR v tabulce 3 pro jednotlivá rozpouštědla a roztoky nanočástic se vzájemně pochopitelně značně liší, což souvisí především s faktem, že je pokaždé vybrán jiný pás, který je však charakteristický pro příslušný systém.

Kromě výrazně vyššího SNR u SERS/SERRS spekter změřených na Ramanově spektrometru na PřF patří k dalším výhodám této sestavy i snadnější kalibrace a seřízení optiky, které probíhají automaticky.

Nicméně nutno poznamenat, že na Lékařské fakultě je možno realizovat i měření s uplatněním termostatu, a tím definovaně hlídat teplotu vzorku. Dále s ohledem na výkonnější laser, který je na LF k dispozici, je také větší variabilita nastavení výkonu laseru.

4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat spektra Ramanova a povrchem zesíleného Ramanova rozptylu změřených na dvou odlišných sestavách Ramanova spektrometru, ale za jinak stejných podmínek nastavení. Shodná excitační vlnová délka (532 nm) měla zajistit, že charakter spekter pro jistou sloučeninu bude stejný bez ohledu na použitou sestavu. Oba Ramanovy spektrometry měly nastavený stejný výkon laseru 10 mW, i když jsme měřili na Ramanově spektrometru na Lékařské fakultě (LF) i při výkonu laseru 100 mW.

Hlavní sledovanou charakteristikou kvality signálu na každé ze sestav Ramanova spektrometru použitých v této bakalářské práci byl poměr signálu k šumu (SNR). Téměř vždy jsme na Přírodovědecké fakultě (PřF) dostali lepší poměr SNR, až na případ tetrahydrofuranu. Dále jsme na PřF většinou dostali spektra s větší intenzitou Ramanova rozptylu, ale na LF tato spektra začínala na mnohem vyšší hladině intenzity.

Byla změřena spektra pro různé systémy s cílem vyzkoušet rozdílné metody zesílení Ramanova rozptylu. Voda, acetonitril a tetrahydrofuran byly měřeny pro účely normální Ramanovy spektroskopie. Porfyrin, díky svým pyrrolovým cyklům, rezonuje s použitou vlnovou délkou (532 nm) a dochází k měření rezonančního Ramanova rozptylu (RRS). Zlaté a stříbrné koloidní roztoky se využívají při povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS), a spolu s porfyrinem dojde k měření povrchem zesílené rezonanční Ramanově spektroskopie (SERRS).

Kalibrace přístroje na Přírodovědecké fakultě je mnohem snazší než na Lékařské fakultě, probíhá totiž před vlastním měřením vzorků automaticky pomocí softwaru, který je nainstalovaný v PC. Naproti tomu na Lékařské fakultě je nutno, po změření spekter Ramanova rozptylu, provést recalibraci pomocí externího programu. Tento program je schopen kalibrovat již naměřená spektra, ale v době zpracování této bakalářské práce tento program bohužel nebyl k dispozici ve funkční podobě. Proto je v některých společných spektrech z Přírodovědecké a Lékařské fakulty vidět rozdílný Ramanův posun v řádu několika cm^{-1} .

Další nevýhodou na Lékařské fakultě je složitost seřízení optických komponent. Musí se správně seřídít čočky, aby dráha paprsku byla co nejvýhodnější, paprsek dopadal na štěrbinu monochromátoru a pak do detektoru, a nedocházelo tak ke ztrátám signálu. Oproti tomu na Přírodovědecké fakultě toto seřízení probíhá automaticky pomocí softwaru.

Rozdíl v obou Ramanových spektrometrech je také v uspořádání, délce optické dráhy a teplotě chlazení detektoru. Na PŘF je detekován zpětný rozptyl, přístroj nepřesahuje rozměr 1 m a detektor je chlazen termoelektricky na 223 K; kdežto přístroj na LF je v uspořádání 90°, umístěný na masivní optické lavici a detektor je chlazen pomocí kapalného dusíku na teplotu 100 K.

Výhodou Ramanova spektrometru na Lékařské fakultě je možnost měření vzorků v termostatované cele a větší variabilita při volbě výkonu laseru.

Lze tedy závěrem říci, že každá ze sestav Ramanova spektrometru má své výhody a nevýhody.

5. Summary

This bachelor thesis aims to compare Raman and Surface-Enhanced Raman scattering spectra recorded on two different setups, but otherwise using the same experimental conditions. The same excitation wavelength (532 nm) should provide the same character of the spectra of a particular compound regardless the setup used. Both Raman spectrometers were adjusted to the same laser power, 10 mW, although we measured also at 100 mW using the Raman spectrometer at Faculty of Medicine.

The main characteristic of the signal quality for each of the Raman spectrometers employed in this Bachelor thesis was the signal-to-noise ratio (SNR). Nearly always, except the case of tetrahydrofuran, we got a better SNR ratio at Faculty of Science (FS) than at Faculty of Medicine (FM). Furthermore, we usually got spectra with a greater intensity of Raman scattering at FS, but spectra at FM started on a much higher level of intensity.

Spectra for different systems were measured to test different methods of Raman scattering enhancement. Water, acetonitrile and tetrahydrofuran were measured by normal Raman spectroscopy. Porphyrin, which due to its pyrrole cycles resonates with the used laser wavelength (532 nm), was measured by resonance Raman scattering (RRS). Gold and silver colloidal solutions are exploited in surface-enhanced Raman scattering spectroscopy (SERS), and in the combination with the porphyrin, surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) was measured.

Calibration of spectrometer at FS is much easier than that at FM, because of the fact that before the measurement of samples the spectrometer at FS is calibrated automatically from the software which is installed on PC. On the contrary, after recording spectra on the spectrometer at FM, it is necessary to do recalibration using an external program. This program is able to calibrate as-measured spectra, but in the time of writing this Bachelor thesis, this program was not available in a functional form. Therefore, in Raman spectra of a particular compound stemming from the two employed spectrometers (at FS vs. FM), different Raman shifts of a few cm^{-1} can be observed.

Another disadvantage of the spectrometer at FM lies in the alignment of optical components. Lenses have to be properly adjusted so that the beam path becomes the most useful, beam gets into the monochromator slit and then into detector, and there have to be no signal losses. On the contrary, the alignment of the spectrometer at FS is

done automatically by software.

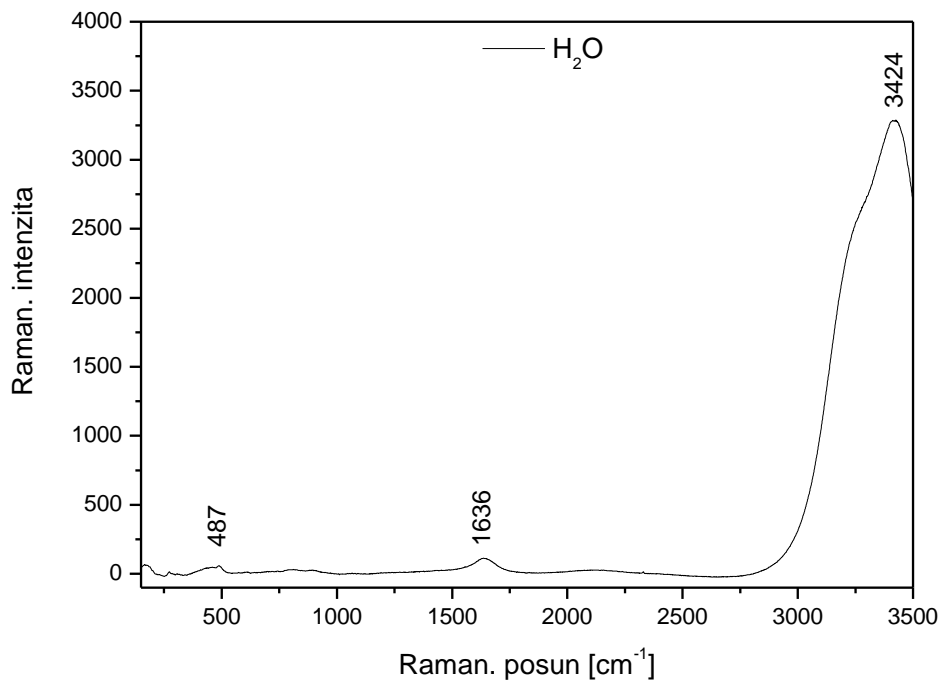
The difference in the two Raman spectrometers is also in the arrangement, the length of the optical path and temperature of cooling of the detector. At FS, back scattering is detected, the device does not exceed the size of about 1 meter and the detector is thermoelectrically cooled down to 223 K; while at FM, the device is in 90° arrangement, placed on a massive optical bench and the detector is cooled with liquid nitrogen to the temperature of 100 K.

The advantage of Raman spectrometer at FM is the ability to measure samples in a thermostatically controlled cell and a greater variability in the choice of laser power.

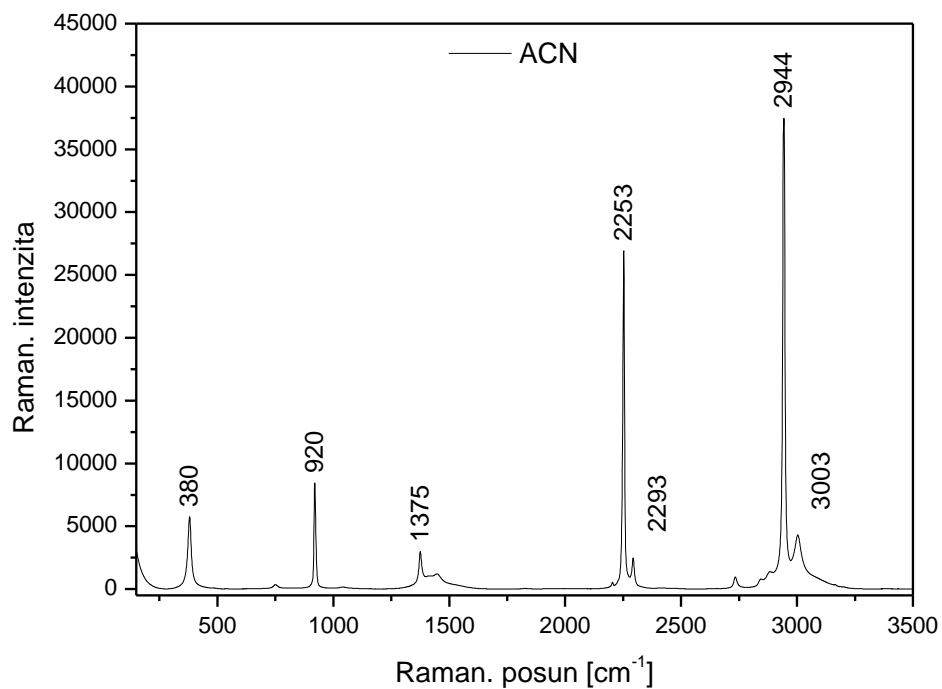
It can be thus summarized that each of the Raman spectrometers has its advantages and disadvantages.

6. Přílohy

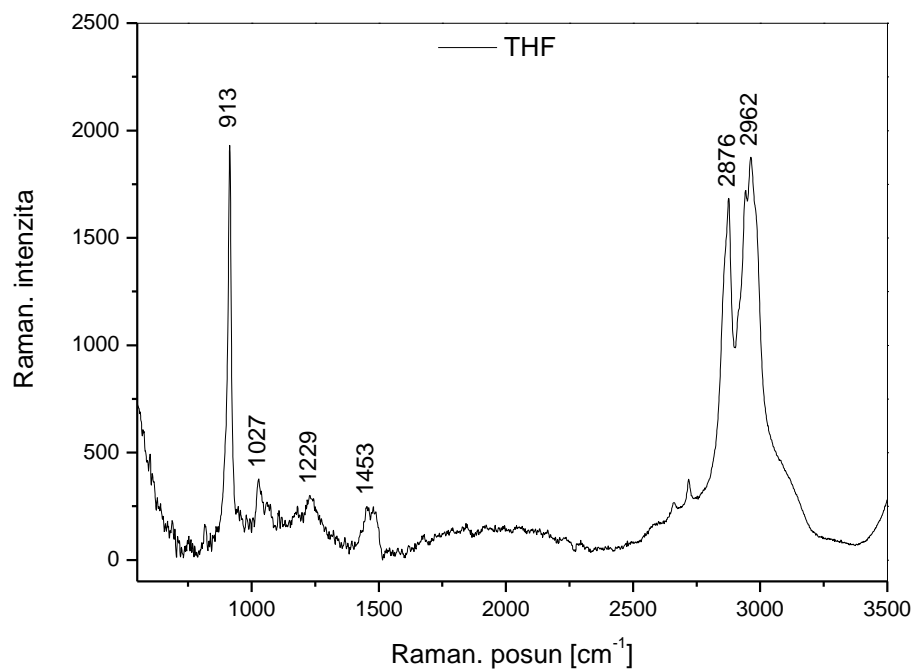
Spektra jednotlivých látek měřených na spektrometru na Přírodovědecké fakultě



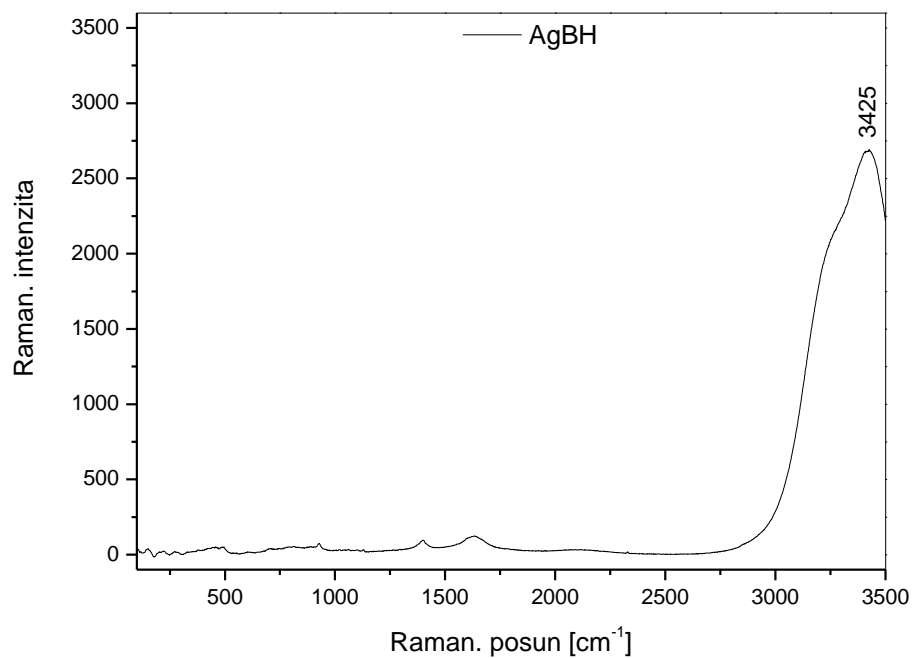
Obrázek 33: Ramanovo spektrum vody na PŘF



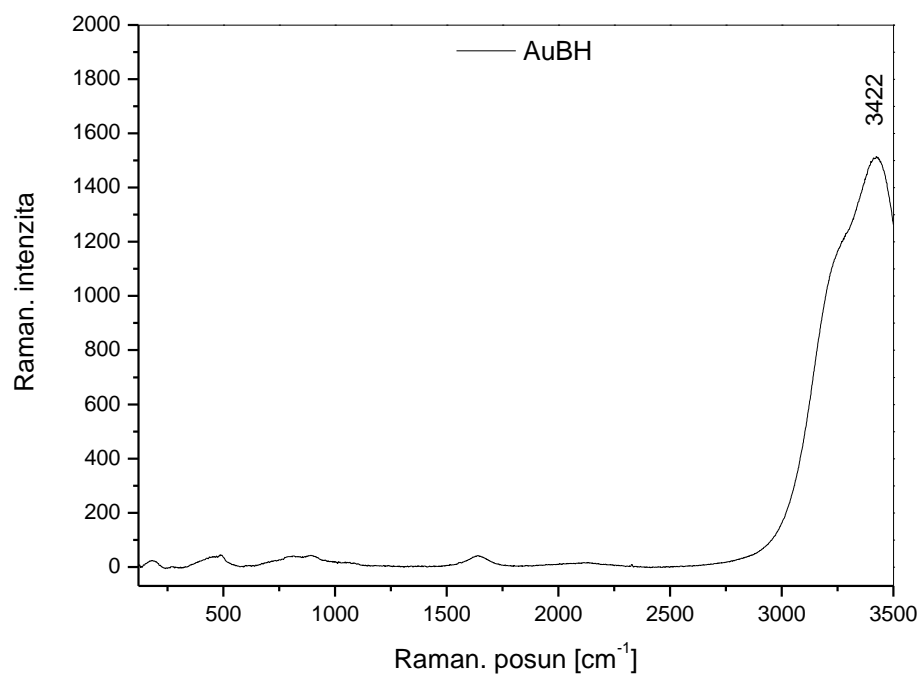
Obrázek 34: Ramanovo spektrum acetonitrilu na PŘF



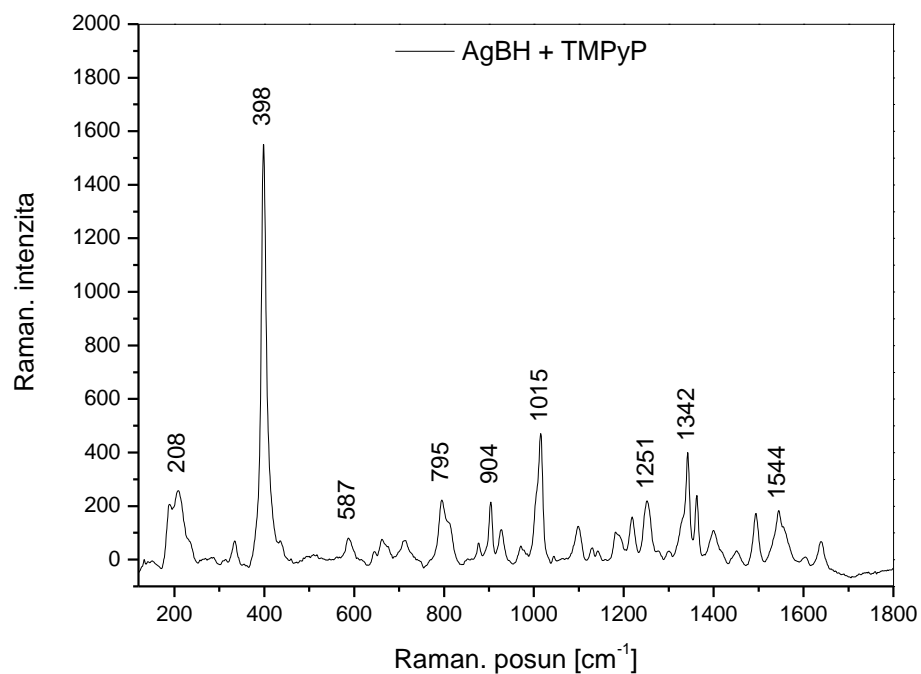
Obrázek 35: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu na PřF



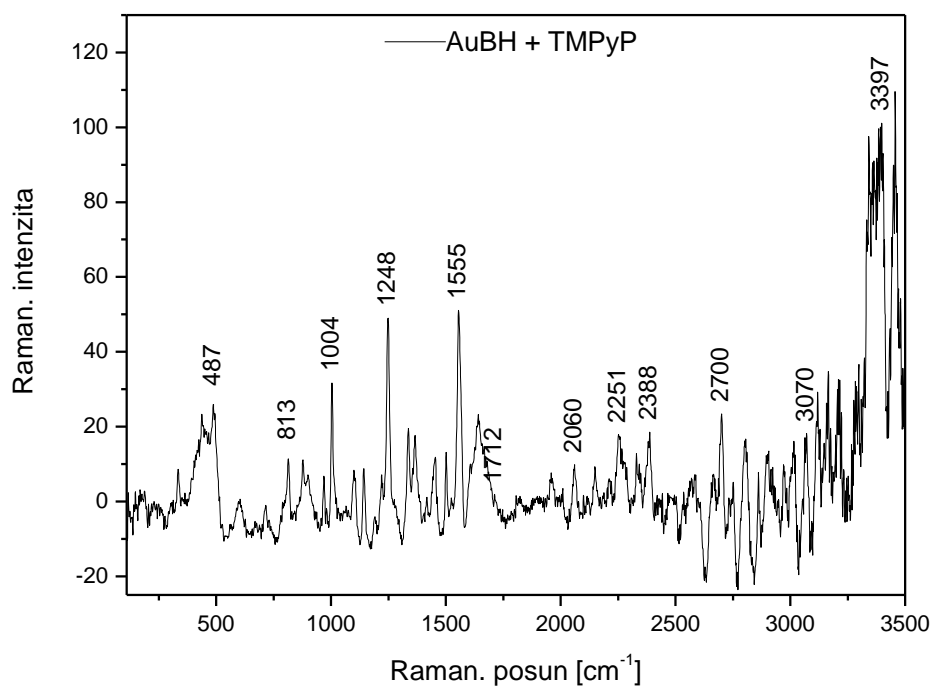
Obrázek 36: Ramanovo spektrum AgBH na PřF



Obrázek 37: Ramanovo spektrum AuBH na PTFE

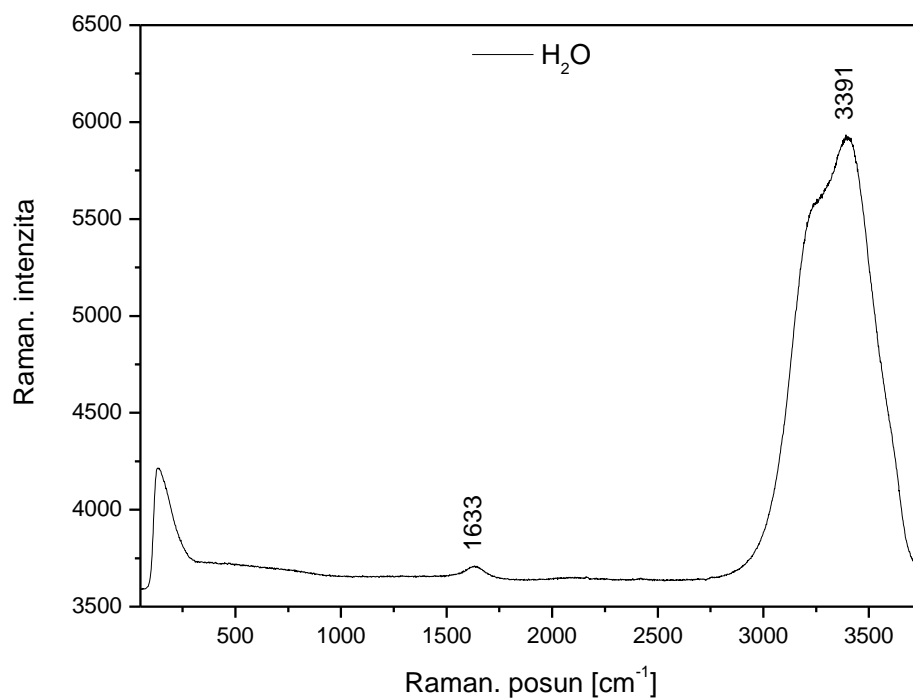


Obrázek 38: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na PTFE

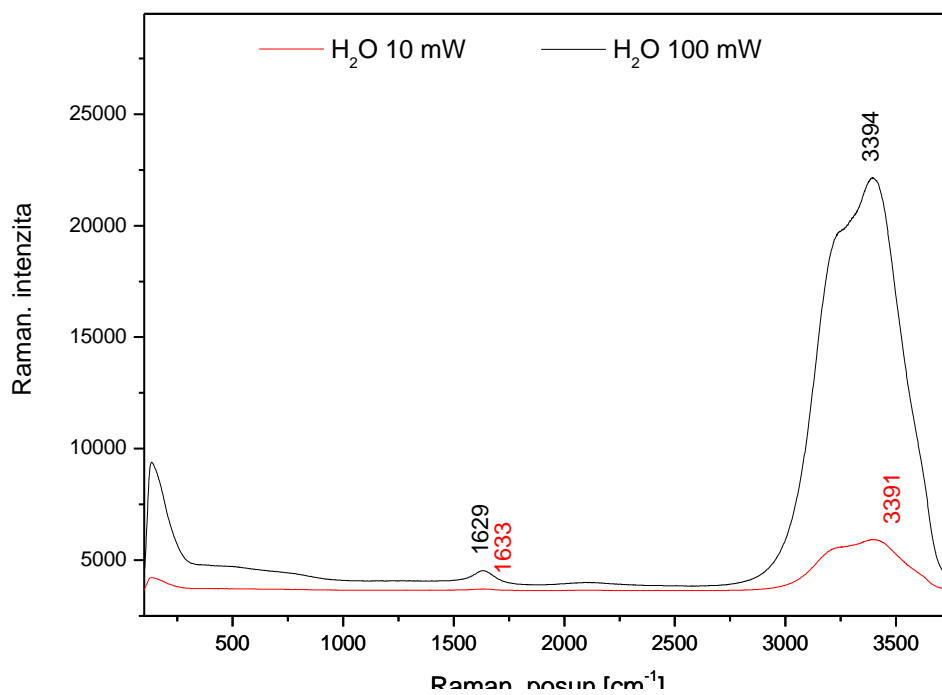


Obrázek 39: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na PŘF

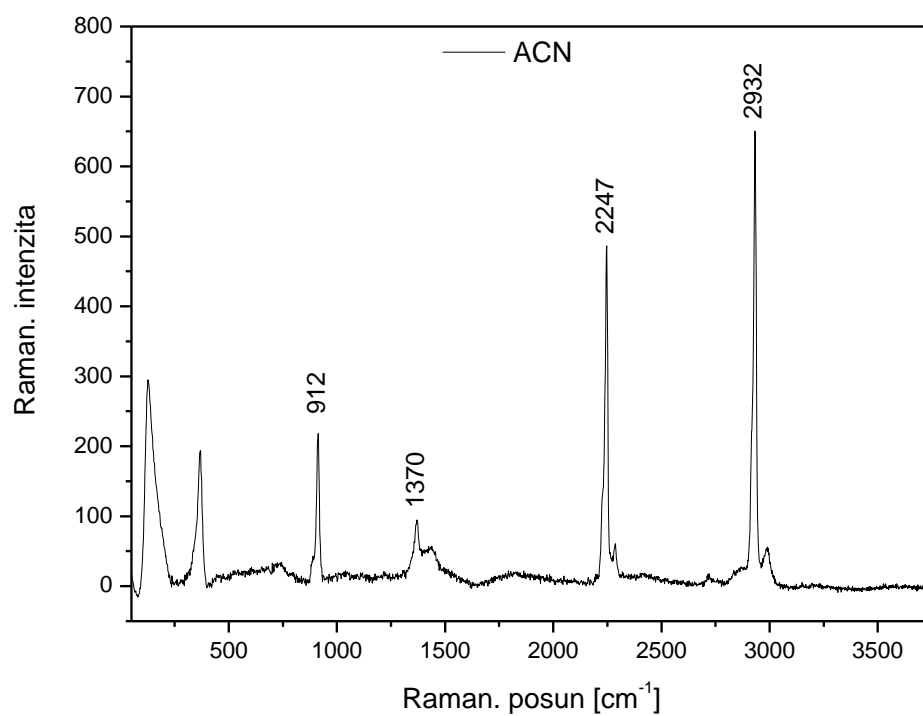
Spektra jednotlivých látek měřených na spektrometru na Lékařské fakultě



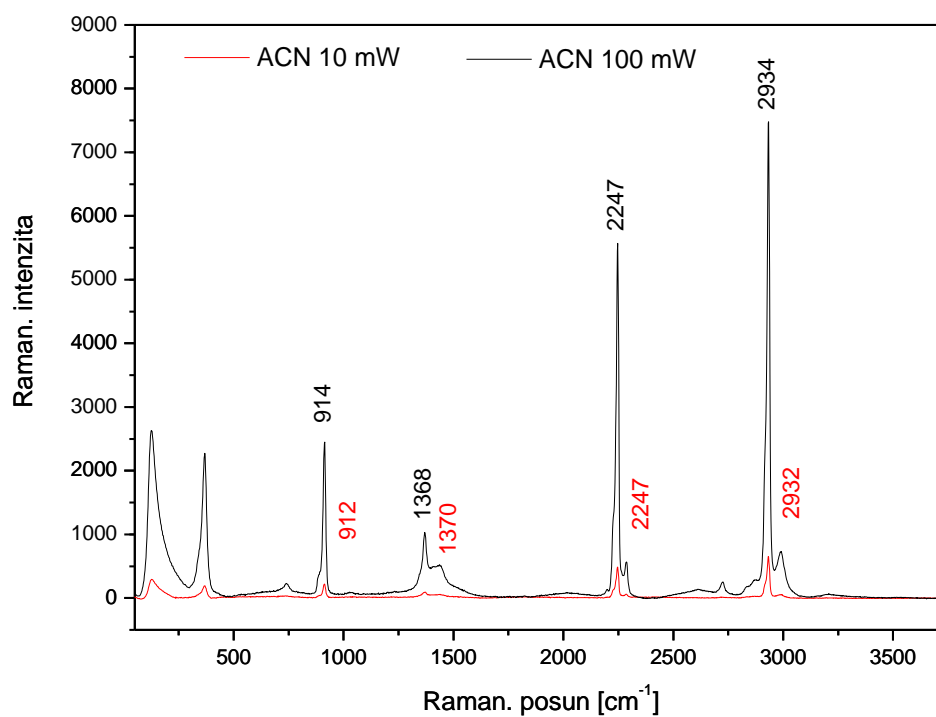
Obrázek 40: Ramanovo spektrum vody na LF



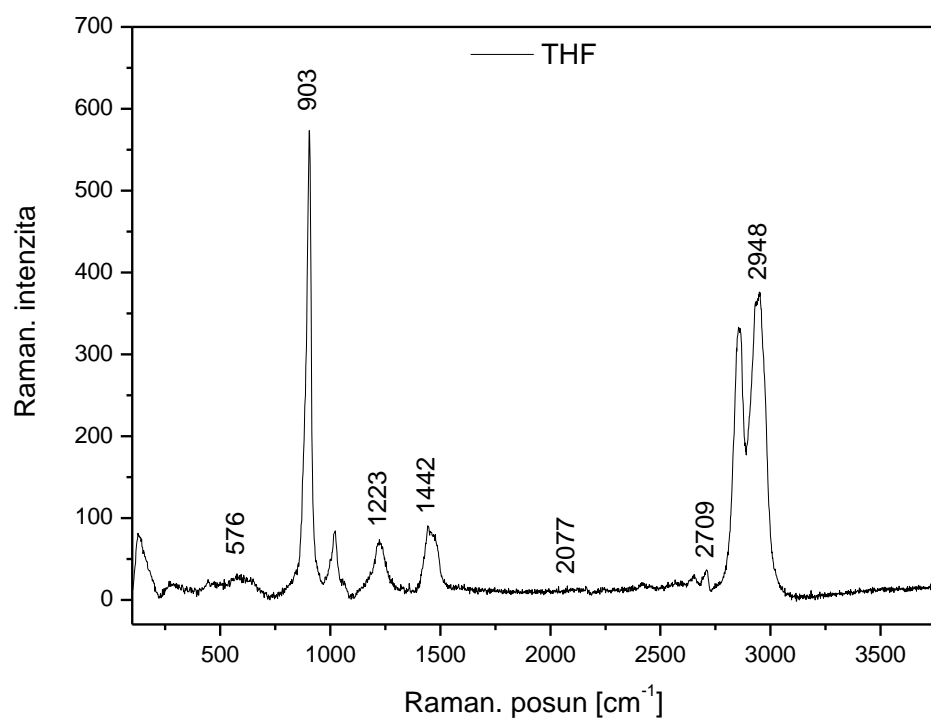
Obrázek 41: Ramanovo spektrum vody na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



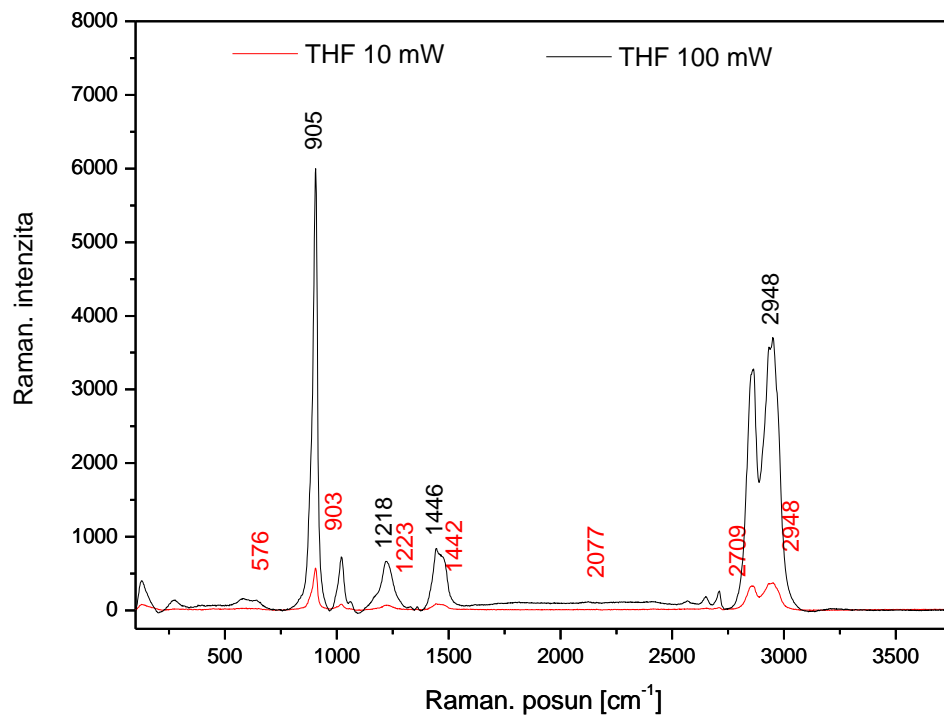
Obrázek 42: Ramanovo spektrum acetonitrilu na LF



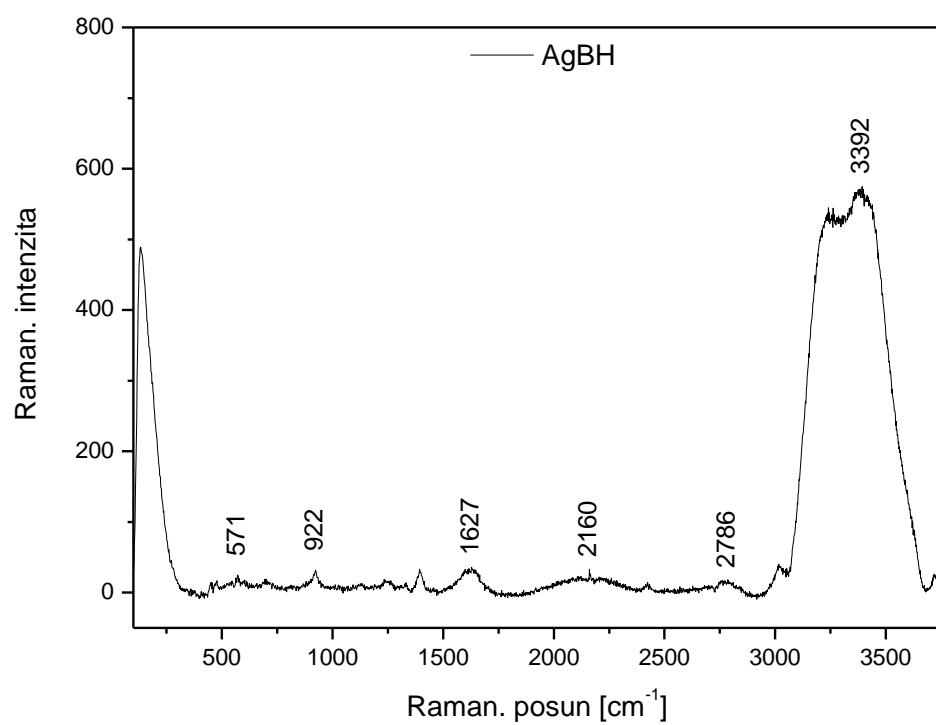
Obrázek 43: Ramanovo spektrum acetonitrilu na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



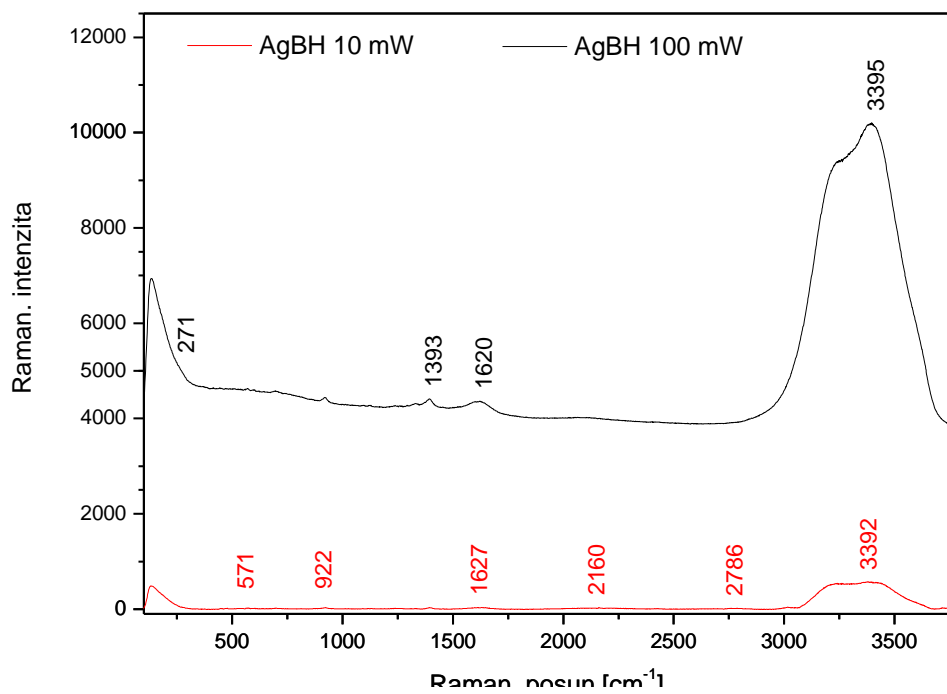
Obrázek 44: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu na LF



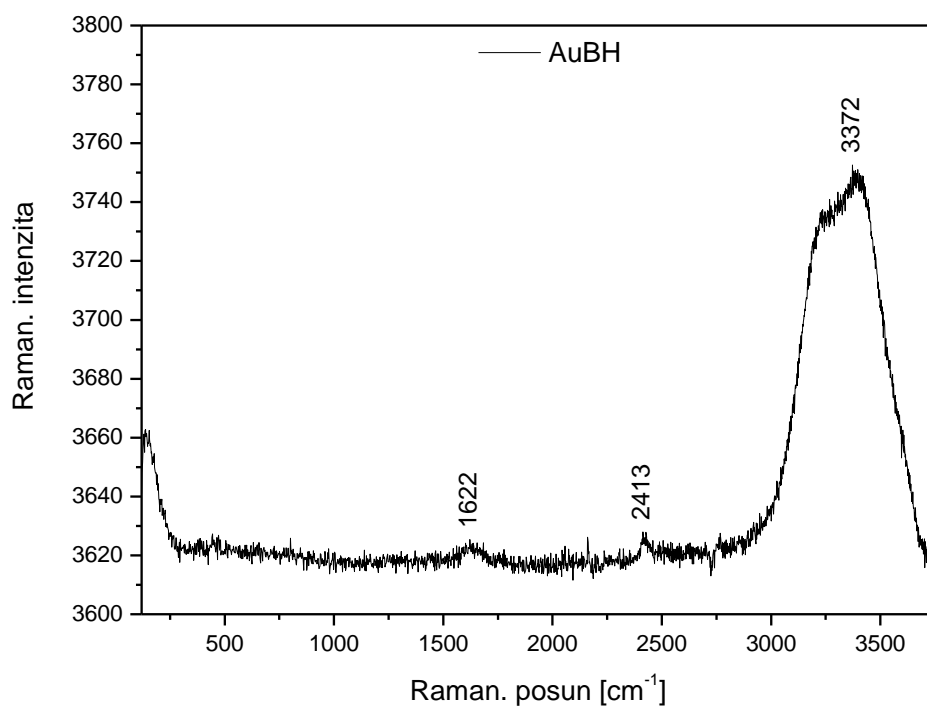
Obrázek 45: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



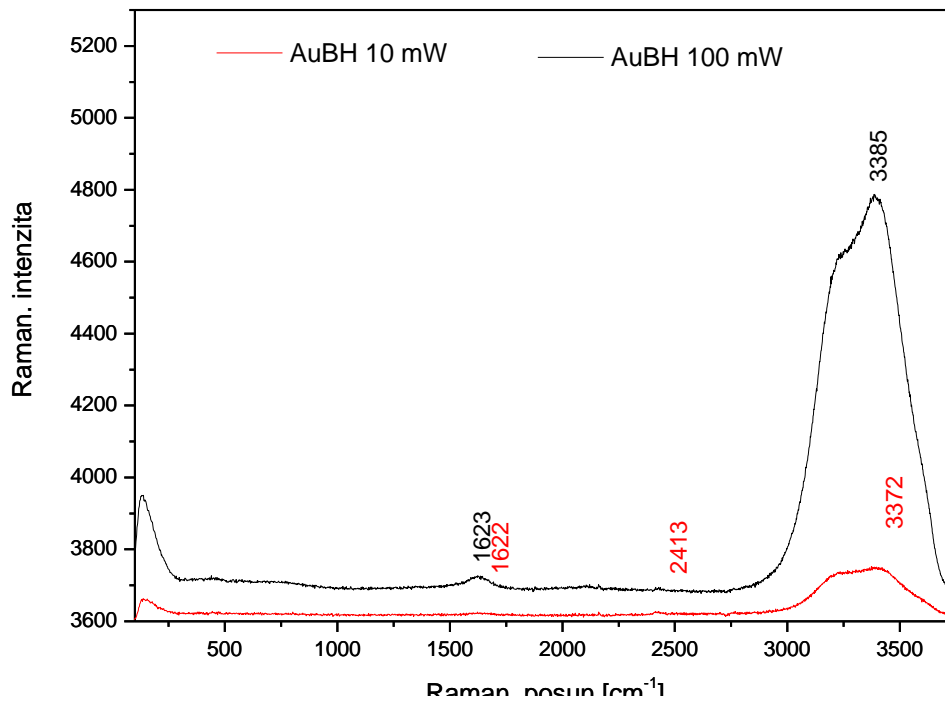
Obrázek 46: Ramanovo spektrum AgBH na LF



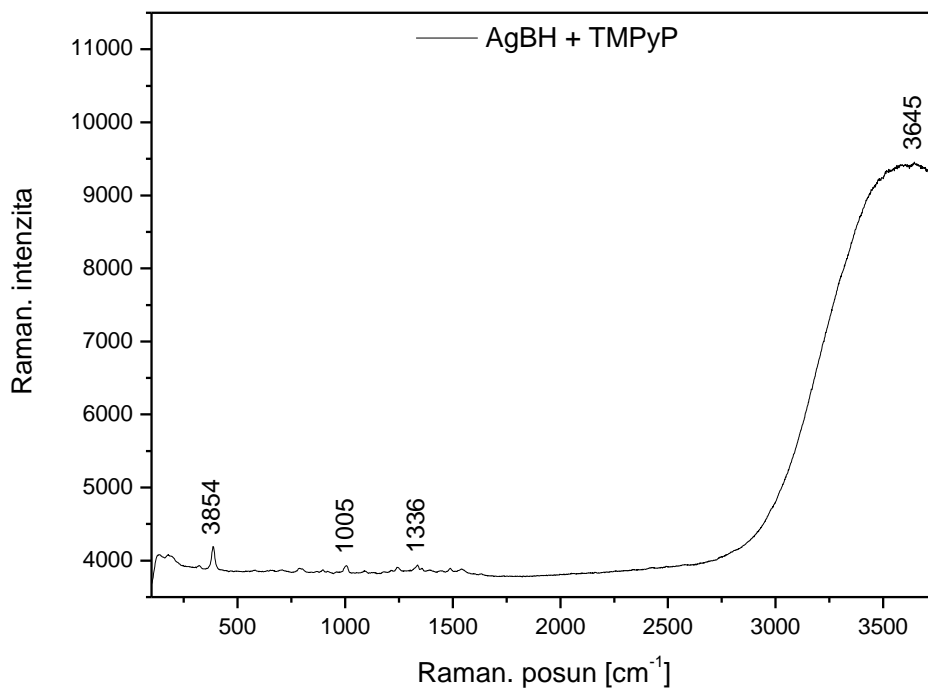
Obrázek 47: Ramanovo spektrum AgBH na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



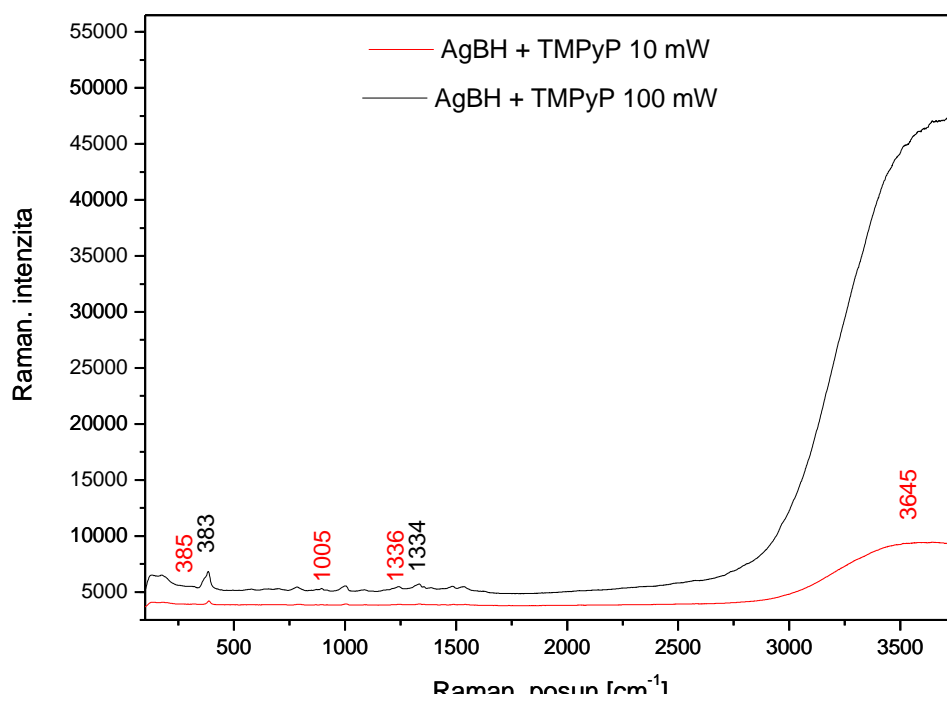
Obrázek 48: Ramanovo spektrum AuBH na LF



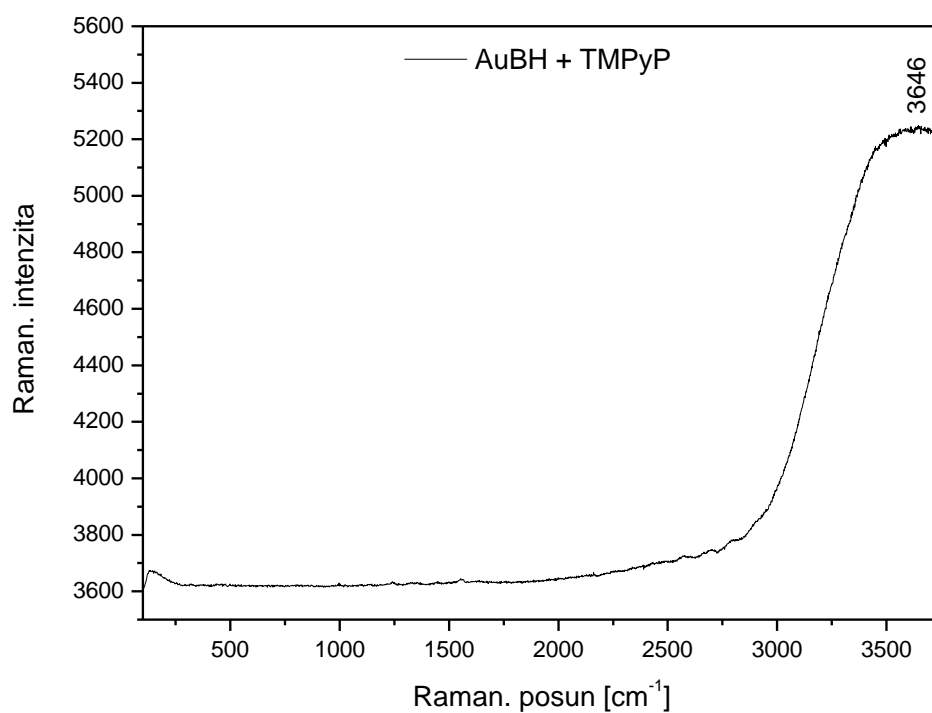
Obrázek 49: Ramanovo spektrum AuBH na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



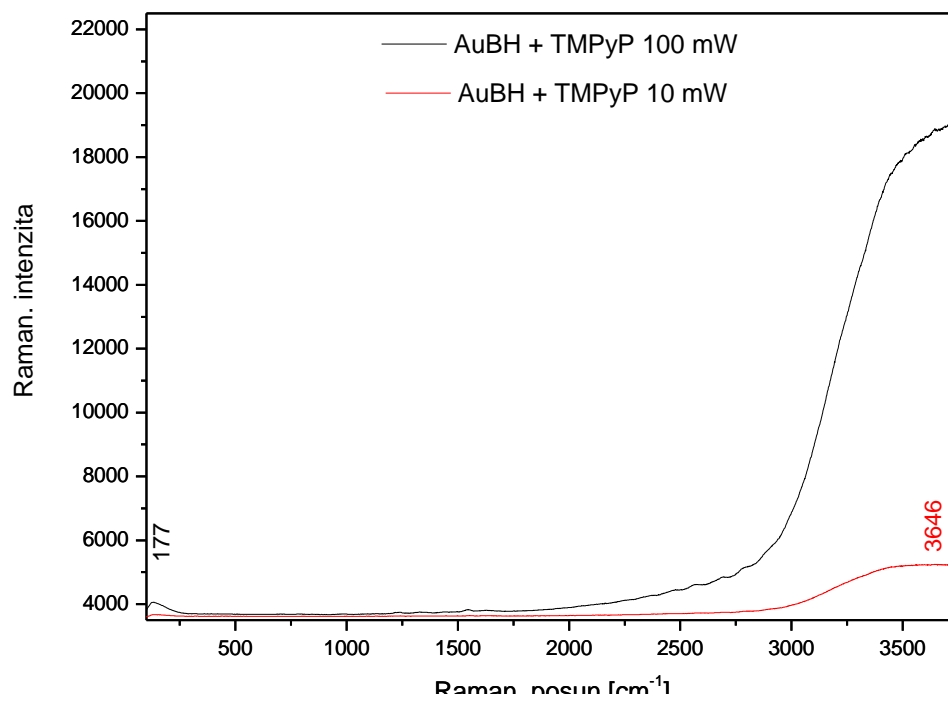
Obrázek 50: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na LF



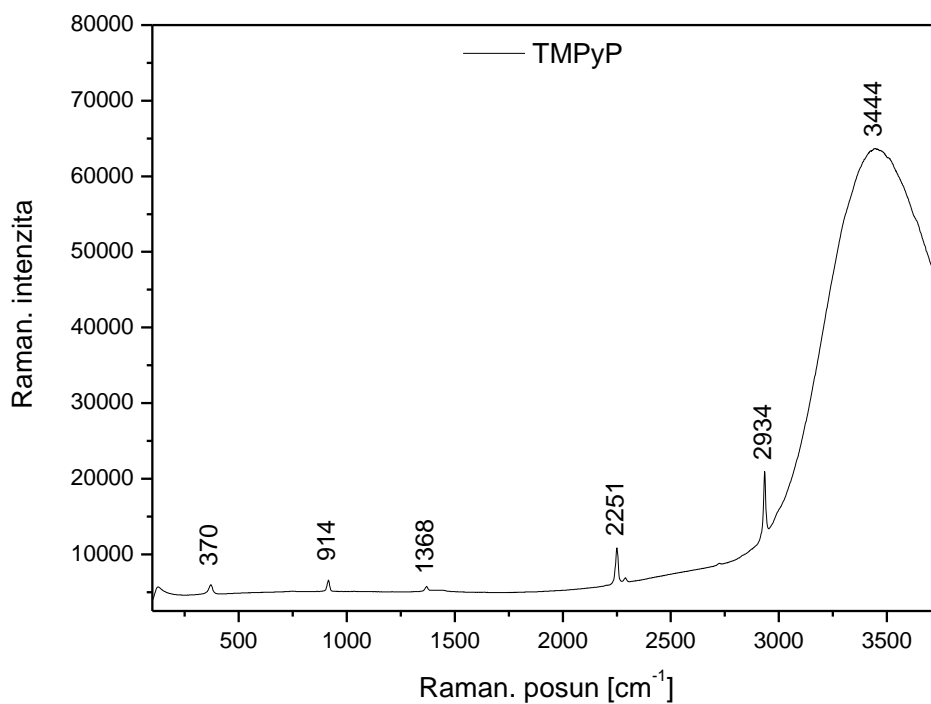
Obrázek 51: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



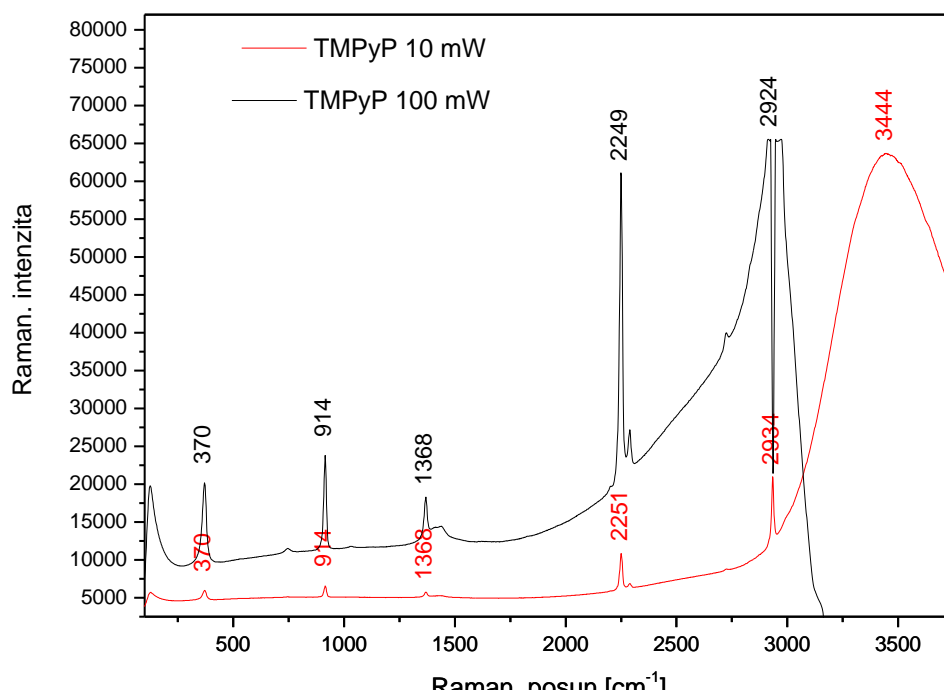
Obrázek 52: Ramanovo spektrum AuBH s porfyrinem na LF



Obrázek 53: Ramanovo spektrum AuBH s porfyrinem na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW



Obrázek 54: Ramanovo spektrum porfyrinu na LF



Obrázek 55: Ramanovo spektrum porfyrinu na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW

7. Seznam obrázků

Obrázek 1: Valenční vibrace.....	11
Obrázek 2: Deformační vibrace pro molekulu benzenu	11
Obrázek 3: C. V. Raman ²⁴	16
Obrázek 5: Stokesovy a anti-Stokesovy linie	18
Obrázek 4: Ramanův rozptyl	18
Obrázek 6: Schéma Ramanova spektrometru	23
Obrázek 7: 90° uspořádání.....	27
Obrázek 8: 180° uspořádání.....	27
Obrázek 9: Tetrahydrofuran.....	32
Obrázek 10: Acetonitril	32
Obrázek 11: Kationtový ve vodě rozpustný porfyrin	33
Obrázek 12: Thermo Scientific DXR Raman Microscope	35
Obrázek 13: Ramanův spektrometr na LF	36
Obrázek 14: UV/Vis spektrum vody	38
Obrázek 15: UV/Vis spektrum acetonitrilu	39
Obrázek 16: UV/Vis spektrum tetrahydrofuranu.....	39
Obrázek 17: UV/Vis spektrum porfyriu	40
Obrázek 18: UV/Vis spektrum AgBH a AuBH.....	41
Obrázek 19: UV/Vis spektrum AgBH a AuBH s porfyrinem	42
Obrázek 20: UV/Vis spektrum zlata s porfyrinem a bez něj	42
Obrázek 21: UV/Vis spektrum stříbra s porfyrinem a bez něj	43
Obrázek 22: Ramanovo spektrum vody na PřF a LF.....	44
Obrázek 23: Přiblížený deformační pás vody na PřF	45
Obrázek 24: Ramanovo spektrum acetonitrilu	45
Obrázek 25: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu.....	46
Obrázek 26: Ramanovo spektrum porfyriu	47
Obrázek 27: Ramanovo spektrum AgBH	48
Obrázek 28: Srovnání AgBH a vody na PřF.....	48
Obrázek 29: Ramanovo spektrum AuBH	49
Obrázek 30: Srovnání AuBH a vody na PřF.....	50
Obrázek 31: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem.....	51
Obrázek 32: Ramanovo spektrum AuBH s porfyrinem.....	51
Obrázek 33: Ramanovo spektrum vody na PřF	57
Obrázek 34: Ramanovo spektrum acetonitrilu na PřF	57
Obrázek 35: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu na PřF	58
Obrázek 36: Ramanovo spektrum AgBH na PřF.....	58
Obrázek 37: Ramanovo spektrum AuBH na PřF.....	59
Obrázek 38: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na PřF	59
Obrázek 39: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na PřF	60
Obrázek 40: Ramanovo spektrum vody na LF	61
Obrázek 41: Ramanovo spektrum vody na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW	61
Obrázek 42: Ramanovo spektrum acetonitrilu na LF	62
Obrázek 43: Ramanovo spektrum acetonitrilu na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW .	62
Obrázek 44: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu na LF	63
Obrázek 45: Ramanovo spektrum tetrahydrofuranu na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW.....	63
Obrázek 46: Ramanovo spektrum AgBH na LF.....	64
Obrázek 47: Ramanovo spektrum AgBH na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW	64

Obrázek 48: Ramanovo spektrum AuBH na LF	65
Obrázek 49: Ramanovo spektrum AuBH na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW	65
Obrázek 50: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na LF	66
Obrázek 51: Ramanovo spektrum AgBH s porfyrinem na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW	66
Obrázek 52: Ramanovo spektrum AuBH s porfyrinem na LF	67
Obrázek 53: Ramanovo spektrum AuBH s porfyrinem na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW	67
Obrázek 54: Ramanovo spektrum porfyrinu na LF	68
Obrázek 55: Ramanovo spektrum porfyrinu na LF při výkonu laseru 10 a 100 mW	68

8. Použitá literatura

- ¹ BAKÁREK, V.; FRYŠOVÁ, I. *Optické metody v chemické analýze*. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 61 s. ISBN 978-80-244-1754-7
- ² NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ L.; RYCHLOVSKÝ P. *Spektrometrické analytické metody I.* 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 166 s. ISBN 80-246-0776-X
- ³ MATĚJKA, P. a kolektiv. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie III*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002. 17 s. ISBN 80-7080-466-1
- ⁴ STUŽKA, V. *Instrumentální metody chemické analýz, IV. Vibrační spektroskopie organ. molekul*. 1. vyd. Olomouc: rektorát Univerzity Palackého v Olomouci, 1976. 146 s.
- ⁵ MALOŇ, P.; PODLAHA, J. *Fyzikálně-chemické metody, část I*. 23. svazek cyklu Organické chemie. 1. vyd. Praha: ÚOCHB AV ČR. 1999. 151 s. ISBN 80-902130-9-X
- ⁶ KSANDR, Z.; ADÁMEK, P.; JANEČKOVÁ, E. *Infračervená spektroskopie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1975. 130 s.
- ⁷ KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- ⁸ MILATA, V. a kol. *Aplikovaná molekulová spektroskopie* 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislavě. 2008. 602 s. ISBN 978-80-227-2960-4
- ⁹ FERRARO, J. R., NAKAMOTO, K., BROWN, CH. W., *Introductory Raman Spectroscopy*. 2nd ed. San Diego: Academic Press. 2003. 434 s. ISBN 978-0-12-254105-6
- ¹⁰ BOBER, J. *Laureáti Nobelovy ceny*. Přeložila Veira Gantnerová. 1. vyd. Bratislava: Obzor, 1971. 378 s.
- ¹¹ SODOMKA, L.; SODOMKOVÁ, M.; SODOMKOVÁ, M. *Kronika Nobelových cen I*. 1. vyd. Liberec: Adhesiv, 2002. 424 s. ISBN 80-238-9205-5
- ¹² SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R., *Principles of Instrumental analysis*, 6th ed. Canada: Thomson Books. 2007. 1093 s. ISBN 13:978-0-495-01201-7
- ¹³ LINDON, J. C., TRANTER, G. E., HOLMES J. L., *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. London: Academic Press. 2000. Volume 3
- ¹⁴ matejkap. *Ramanova spektrometrie* [online]. 2011. [cit. 2013-03-08]. <<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>>
- ¹⁵ AMER, M. S., *Raman Spectroscopy for Soft Matter Applications*. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons. 2009. 301 s. ISBN 978-0-470-45383-4
- ¹⁶ JODIO, A., DRESSENHAUS, M., SAITO, R., DRESSELHAUS, G. F., *Raman Spectroscopy in Graphene Related Systems*. 1st ed. Německo: Wiley-VCH. 2011. 354 s. ISBN 978-3-527-40811-5
- ¹⁷ SALZER, R., SIESLER, H. W., *Infrared and Raman Spectroscopic Imaging*. 1st ed. Německo: Wiley-VCH. 2009. 510 s. ISBN 978-3-527-31993-0
- ¹⁸ SCHLÜCKER, S., *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*. 1st ed. Německo: Wiley-VCH. 2011. 331 s. ISBN 978-3-527-32567-2
- ¹⁹ GRIMMER, J.; MÁLEK, M.; SANTHOLZER, R. *Organická rozpouštědla*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1956. 200 s.

²⁰ ŠAFARÍK, L.; STRÁNSKÝ, Z. *Odměrná analýza v organických rozpouštědlech*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1982. 400 s.

²¹ MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W., *Harperova biochemie*. 4. vyd. Jinočany: H+H. 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3

²² COTTON, T. M., SCHULZ, S. G., VAN DUVNE, R. P., Surface-enhanced resonance Raman scattering from water-soluble porphyrins adsorbed on a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*. December 1982, vol. 104, s. 6528-6532

²³ PROCHÁZKA, M., TURPIN, P. Y., ŠTĚPÁNEK, J., VLČKOVÁ, B., SERRS of free base porphyrin in laser-ablated colloids: evidence for three different spectral porphyrin forms. *Journal of Raman Spectroscopy*. May 2002. vol. 33. S. 758-760

²⁴ Nobelprize.org, *The Official Web Site of the Nobel Prize* [online]. 2013. [cit. 2013-03-08]. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman.html>